

Aus der Klinik für Hepatologie und Gastroenterologie, Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen über Wirkung und Wirkungsmechanismen
von Cholecystokinin im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die
gastrointestinale Motilität**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von

Annika K. Sonntag
aus Urbana, Illinois, USA

Datum der Promotion: 22. September 2006

Gutachter: Prof. Dr. med. H. Mönnikes
Prof. Dr. M. Schemann
Prof. Dr. H.-J. Krammer

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung</i>	5
1.1	<i>Integration von Gehirn und Verdauungstrakt</i>	5
1.2	<i>Das autonome Nervensystem</i>	5
1.3	<i>Mediatoren mit Einfluss auf gastrointestinale Funktionen</i>	7
1.4	<i>Cholecystokinin</i>	8
1.5	<i>Die Cholecystokinin-Rezeptoren</i>	10
1.6	<i>Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus und dessen Interaktion mit anderen autonomen Hirnkernen</i>	11
1.7	<i>Fragestellungen</i>	14
2	<i>Material und Methoden</i>	16
2.1	<i>Materialien</i>	16
2.1.1	<i>Chemikalien</i>	16
2.1.2	<i>Geräte</i>	17
2.1.3	<i>Verschiedenes</i>	18
2.2	<i>Versuchstiere</i>	19
2.3	<i>Peptide</i>	19
2.4	<i>Lösungen</i>	19
2.4.1	<i>Phosphatpuffer</i>	19
2.4.2	<i>Zamboni-Lösung</i>	20
2.4.3	<i>Lösungen für die Nissl-Färbung</i>	20
2.5	<i>Histologie</i>	21
2.5.1	<i>Beschichtung von Objektträgern</i>	21
2.5.2	<i>Gewebefixation</i>	21
2.5.3	<i>Kryostatpräparation</i>	22
2.5.4	<i>Aufziehen der Gewebeschnitte</i>	22
2.5.5	<i>Nissl-Färbung</i>	22
2.5.6	<i>Klärung und Eindeckung der Präparate</i>	23
2.6	<i>Vorbereitung der Tiere</i>	23
2.6.1	<i>Implantation einer chronischen cerebralen Mikroinjektionsführungs-kanüle</i>	23
2.6.2	<i>Intracerebrale Mikroinjektion am wachen Tier</i>	25
2.6.3	<i>Lokalisationskontrolle der intracerebralen Mikroinjektion</i>	25
2.6.4	<i>Herstellung chronischer gastrointestinaler Mikrokatheter</i>	26
2.6.5	<i>Implantation gastrointestinaler Mikrokatheter</i>	26
2.6.5.1	<i>Implantation eines chronischen Magenkatheters</i>	26
2.6.5.2	<i>Implantation eines chronischen Duodenalkatheters</i>	27
2.6.5.3	<i>Implantation eines chronischen Colonkatheters</i>	27
2.7	<i>Bestimmung gastrointestinaler Funktionen</i>	28

2.7.1	<i>Bestimmung der Magenentleerung</i>	28
2.7.2	<i>Bestimmung des Dünndarm- bzw. des Colontransits mit dem geometrischen Zentrum</i>	29
2.7.3	<i>Messung der Colontransitzeit</i>	30
2.8	<i>Versuchsdurchführungen</i>	30
2.8.1	<i>Versuchsablauf zur Bestimmung der Magenentleerung, des Dünndarm- oder des Colontransits</i>	30
2.8.2	<i>Versuchsablauf zur Bestimmung der Colontransitzeit</i>	31
2.9	<i>Statistische Auswertung</i>	32
3	<i>Ergebnisse</i>	33
3.1	<i>Effekt von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die Magenentleerung</i>	33
3.2	<i>Effekt von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Dünndarmtransit</i>	35
3.3	<i>Effekt von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Colontransit</i>	36
3.4	<i>Effekte von CCK-A- und CCK-B-Rezeptor-Antagonisten im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die Colontransitzeit</i>	37
4	<i>Diskussion</i>	39
4.1	<i>Einleitung</i>	39
4.2	<i>Diskussion der Effekte von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die Magenentleerung und den Dünndarmtransit</i>	39
4.3	<i>Auswirkungen von CCK auf den Migrating Motor Complex</i>	40
4.4	<i>Diskussion der Effekte von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Colontransit</i>	41
4.5	<i>Die lokalisationspezifische Wirkung der diskutierten Ergebnisse</i>	42
4.6	<i>Diskussion der CCK-Rezeptor vermittelten endogenen Effekte im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Colontransit</i>	43
4.7	<i>Die Rolle des PVN innerhalb des zentralen autonomen Netzwerkes für die ZNS-Regulation der gastrointestinalen Motilität</i>	44
4.8	<i>Modulation der gastrointestinalen Motilität durch andere Neurotransmitter</i>	46
4.9	<i>Der Effekt von CCK auf die Sättigung</i>	47
5	<i>Zusammenfassung</i>	49
	<i>Abkürzungen</i>	52
	<i>Literaturverzeichnis</i>	54
	<i>Anhang</i>	67
	<i>Tabellarischer Lebenslauf</i>	67
	<i>Danksagung</i>	69
	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i>	70

1 Einleitung

1.1 Integration von Gehirn und Verdauungstrakt

Es ist seit langem bekannt, dass das Gehirn und somit auch die Psyche Einfluss auf gastrointestinale Funktionen ausübt.

Beaumonts beschrieb, wie sich Emotionen in der Änderung der Magensäuresekretion und Magenentleerung widerspiegeln³. Pavlow, der als Begründer der experimentellen Psychologie gilt, konnte durch tierexperimentelle Untersuchungen weitere Erkenntnisse zur Interaktion des Gehirns mit dem Verdauungstrakt liefern. So stellte er 1910 die Behauptung auf, dass der Appetit durch ein hypothalamisches Sättigungszentrum reguliert wird, welches Informationen aus dem Verdauungstrakt erhält⁹⁰. Diese Vermutung ist heute Gewißheit.

Einige weitere gut bekannte Beispiele der Interaktion von Gehirn und Verdauungstrakt sind die Insulinsekretion während der cephalischen Phase, der Effekt von Stress auf die Magensäuresekretion und die Entstehung von Ulzerationen, die Steuerung der exokrinen Pankreassekretion sowie die Modulation der gastrointestinalen Motilität⁹⁶.

Aber auch der umgekehrte Weg dieser Hirn-Darm-Achse, nämlich die afferente Einflussnahme gastrointestinaler Vorgänge auf Abläufe im Gehirn, wie die Erzeugung des Sättigungsgefühls, ist profund wissenschaftlich belegt⁵⁵.

Seit Kenntnis dieser Wechselbeziehung von Gastrointestinaltrakt und Gehirn bemüht sich die Wissenschaft um Aufklärung der diesen Vorgängen zugrunde liegenden strukturellen, anatomischen und funktionellen hormonalen oder neurochemischen Grundlagen.

1.2 Das autonome Nervensystem

Das autonome Nervensystem besteht aus spezifischen Hirnkernen und -Nerven sowie Ganglien und Plexi in der Peripherie, die die extrinsische Innervation des Gehirns, der Blutgefäße, der glatten Muskulatur und parenchymatöser Organe bewirken. Die integrative regulatorische

Funktion des autonomen Nervensystems ist wesentlich für homöostatische Angleichungsvorgänge im Organismus. Es reguliert die funktionelle Aktivität verschiedenster Organe und Strukturen, die nicht der willkürlichen Kontrolle unterliegen, sondern unbewußt ablaufen. Neben der Blutzirkulation und der Atmung ist die Verdauung eine wichtige durch das autonome Nervensystem modulierte Funktion. Das autonome Nervensystem stellt die strukturelle Basis der neuronalen Integration von Funktionen des Gehirns und des Verdauungstraktes dar. Hierzu gehören Kerngebiete im Hirnstamm (Mesencephalon, Pons und die Medulla oblongata), als auch im Diencephalon und Telencephalon, die durch Projektionen untereinander verbunden sind und durch komplexe neurohormonale Mechanismen autonome Funktionen im Organismus beeinflussen.

Um gastrointestinale Abläufe adäquat modulieren zu können, muß das Gehirn sensorische Informationen vom Gastrointestinaltrakt erhalten. Die Vermittlung von afferenten Informationen aus der Peripherie geschieht über den Vagus und den Splanchnicus an die autonomen Hirnkerne. Das zentrale autonome Netzwerk integriert diese Informationen sowie weitere afferente Einflüsse aus anderen Hirnarealen und reguliert so die Adaptation des Organismus an unterschiedliche Umgebungsbedingungen durch efferente reflektorische oder neuroendokrine Mechanismen. Die durch das autonome Netzwerk ausgelösten Reaktionen erfolgen dabei durch Veränderungen des Gleichgewichtes der Aktivität von Sympathikus und Parasympathikus sowie verschiedener peripherer hormonaler Reaktionssysteme.

Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus, die caudalen Raphe-Kerne, die noradrenerge A-5 Zellgruppe sowie Anteile der Medulla oblongata bewirken eine Änderung der sympathischen Aktivität. Von ihnen ziehen Projektionen zu sympathischen präganglionären Neuronen der Columna intermediolateralis des thorakolumbalen Rückenmarks. Die parasympathische Aktivität bestimmen Neurone des Dorsalen Motornucleus des Vagus (DMV) und des Nucleus ambiguus, von denen aus Bahnen zu parasympathischen Ganglien projizieren, wobei es Hinweise darauf gibt, dass der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus die Aktivität des Dorsalen Vagalen Komplexes (DVK) mittels monosynaptischer Projektionen moduliert. Zahlreiche experimentelle Studien haben gezeigt, dass für die Regulation gastrointestinaler Funktionen u. a.

der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus^{21, 104, 106}, der Locus Coeruleus-Komplex (LCK)^{6, 75, 76} und der Dorsale Vagale Komplex¹¹⁸ von besonderer Bedeutung sind.

1.3 Mediatoren mit Einfluss auf gastrointestinale Funktionen

Die erste Erkenntnis, dass ein hypothalamisches Peptid Einfluss auf die gastrointestinale Motilität hat, obwohl es primär im Gehirn wirkt, kam 1977 von Smith, J. R. et. al. Intracerebroventrikulär appliziertes Thyreotropin-Releasing Hormon (TRH) führte bei anästhesierten Hasen zur Stimulation der Colonmotilität¹¹⁴. Inzwischen konnte eine Vielzahl von regulatorischen Neuropeptiden charakterisiert werden, die sowohl innerhalb des Gehirns als auch des Gastrointestinaltraktes präsent sind und neben lokalen Einflüssen eine bedeutende Rolle für die zentralnervöse Kontrolle gastrointestinaler Funktionen haben. Zu den ersten Studien zur Untersuchung der Rolle von Neuropeptiden für die Hirn-Darm-Achse wurden Peptide oder später entsprechende Antikörper oder Antagonisten in die cerebrospinale Flüssigkeit injiziert und deren Wirkung auf den Verdauungstrakt studiert. Um Informationen über cerebrale neuroanatomische Korrelate dieser Abläufe zu erhalten, wurden die Neurotransmitter und auch ihre Antagonisten direkt in bestimmte Hirnkerne appliziert. So konnten sukzessive beteiligte Transmitter, Strukturen und Regelkreise identifiziert und beschrieben werden.

Viele dieser Neuropeptide und Peptidhormone, die ebenfalls im Gastrointestinaltrakt gefunden wurden, sind an den afferenten Übermittlungen von Informationen des Verdauungstraktes an das Gehirn beteiligt^{31, 40}. Durch den Einsatz von Peptid-Antagonisten und Peptid-Antikörpern konnte demonstriert werden, dass postprandial in der Peripherie sezernierte Peptide eine physiologische Rolle bei der Modulation peripherer Abläufe durch Mechanismen der afferent-efferenten Darm-Hirn Interaktion spielen.

1.4 Cholecystokinin

1928 fanden Ivy und Oldberg heraus, dass der Eintritt von Fett in den Dünndarm zur Sekretion einer Substanz führt, die die Kontraktion der Gallenblase bewirkt⁴². Diese Substanz ist heute bekannt unter dem Namen Cholecystokinin (CCK). Ein Jahr später konnte sie aus dem oberen Intestinaltrakt von Schafen, Schweinen und Rindern isoliert werden.

Weitere Aufklärung in Bezug auf die komplexe Wirkung von CCK brachten die Studien von Jorpes und Mutt 1966. Sie konnten beweisen, dass es sich beim CCK, dem eine kontraktionssteigernde Wirkung auf die Gallenblase zugeschrieben wurde, und beim Pankreozym, das eine Steigerung der Pankreasenzymsekretion bewirkt, um dieselbe Substanz handelt⁴⁵. Bis 1970 wurde Cholecystokinin unter dem Namen Cholecystokinin-Pankreozym geführt, dann einigte man sich auf den Namen Cholecystokinin³⁰.

Durch Untersuchung der Effekte einer exogenen Applikation von CCK wurden weitere Wirkmechanismen identifiziert, wie die CCK-induzierte Sekretion von Insulin und Pankreasspezifischem-Polypeptid.

Mutt und Jorpes charakterisierten CCK 1971 als ein lineares Polypeptid mit 33 Aminosäuren⁷⁹. Zusammen mit dem früher charakterisiertem Gastrin und dem aus der Haut von Fröschen extrahiertem Caerulein gehört CCK aufgrund ihrer weitgehend übereinstimmenden C-terminalen Aminosäuren zur Gastrin-Cholecystokinin-Familie.

Cholecystokinin-33

Lys-Ala-Pro-Ser-Gly-Arg-Val-Ser-Met-Ile-Lys-Asn-Leu-Gln-Ser-Leu-Asp-Pro-Ser-His-Arg-Ile-Asp-Arg-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Human-Gastrin

Glp-Gly-Pro-Trp-Leu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Glu-Ala-Tyr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Caerulein

Glp-Gln-Asp-Tyr-Thr-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂

Die große Heterogenität von CCK konnte aus Gewebeextrakten und Plasma mittels chromatographischer Verfahren und Radioimmunassays nachgewiesen werden^{15,39}.

Mittels sequenzspezifischer Antikörper konnte Rehfeld fünf verschiedene molekulare Formen aufzeigen. Die größeren Moleküle CCK-58, CCK-39 und CCK-33 weisen eine geringe Konzentration im Blutplasma auf und scheinen intrazelluläre Vorstufen der physiologisch aktiveren, kürzeren CCK-Formen zu sein⁹⁹. Bei diesen handelt es sich um CCK-12, CCK-8 und CCK-4. Durch molekulares klonieren konnte Gulber 1984 eine aus 114 Aminosäuren bestehende Vorstufe von CCK, die sowohl im Gehirn wie auch im Darm vorkommt, nachweisen³⁴.

Das C-terminale Octapeptid besitzt alle physiologischen und pharmakologischen Eigenschaften des CCK-33. In der biologischen Aktivität ist es wesentlich effektiver als das große Molekül⁸⁵. Das sulfatierte CCK-8 ist die vorherrschende CCK-Form im Gehirn, weshalb es meist bei Studien über die Wirkung von CCK im ZNS eingesetzt wird¹²⁷.

Mittels neuerer cytologischer Techniken, wie der Immunocytochemie, der *in situ* Hybridisierung und der *in vitro* Autoradiographie konnten Peptide, deren Rezeptoren und deren Genexpressionen genauer untersucht werden. Die weite Verbreitung der verschiedenen CCK Formen in unterschiedlichem Gewebe konnte hierdurch nachgewiesen werden.

Mitte der 70-iger Jahre wurde CCK-33 in den I-Zellen (nach der modifizierten Wiesbadener Klassifikation) des Duodenums und Jejunums identifiziert^{15,93,94}. Dies war der erste Nachweis dieser Substanz in endokrinen Zellen.

Erste Nachweise eines Cholecystokinin-verwandten Peptides im Gehirn erfolgte durch die Arbeitsgruppe um Vanderhaeghen¹²¹. Sie konnte zeigen, dass alle Hirnregionen außer der Epiphyse, der Hypophyse und des Cerebellums bei Säugetieren einen signifikanten Gehalt an CCK aufweisen. Eine besonders hohe Konzentration von CCK findet sich nach Vanderhaeghen im cerebralen Kortex, dem Hippocampus, der Amygdala, dem Hypothalamus und den Hinterhörnern des Rückenmarkes^{16,98,99}. Weiterhin fiel die häufige Koexistenz mit Neurotransmittern, wie Dopamin, Serotonin, GABA, Oxytocin, β -Inhibin, Somatostatin und Substance P auf. Die Konzentration von CCK im Gehirn ist höher als die jedes anderen Neuropeptides. Es ist anzunehmen, dass CCK überwiegend im Gehirn selbst produziert wird, da die Synthese im Pankreas und wohl auch im Darm langsamer abläuft²⁸.

Die Lokalisation von CCK im Gastrointestinaltrakt erfolgte 1979⁴⁹. Im Duodenum und Jejunum befindet sich CCK hauptsächlich in den endokrinen Zellen, während es im Ileum und Colon überwiegend in den Neuronen des Plexus myentericus und des Plexus submucosus lokalisiert ist¹¹⁰. Auch hier fiel eine gehäufte Koexistenz mit anderen Neurotransmittern wie Somatostatin, Neuropeptid Y (NPY), Calcitonin-Gen-Related-Peptide (CGRP) und Acetylcholintransferase auf. Neben der Lokalisation von CCK entlang der Hirn-Darm-Achse konnte es auch noch in anderen Organen identifiziert werden.

CCK besitzt nicht nur die Funktion eines gastrointestinalen Hormons sondern erfüllt auch die Eigenschaften eines Neurotransmitters. Dieses sind folgende:

- Lokalisation in Neuronen⁴⁹,
- Subzelluläre Konzentration in Nervenendigungen¹⁸,
- Nachweis biosynthetischer Vorstufen²⁸,
- Freisetzung bei Depolarisation⁹⁷,
- Nachahmung eines Transmittereffekts¹⁰⁰.

Die weite Verbreitung von CCK im Gehirn und in peripheren Nerven spricht für die große physiologische Bedeutung dieses Transmitters im Organismus.

1.5 Die Cholecystokinin-Rezeptoren

Für die Peptid-Familie „Cholecystokinin-Gastrin“ scheint es ebenso eine „Familie“ ihrer Rezeptoren zu geben, die wohl homolog ist, aber in ihrer strukturellen Spezifität Unterschiede aufweist.

Für CCK sind mit Sicherheit zwei Rezeptortypen mit unterschiedlicher Affinität und Lokalisation zu nennen. Der CCK-A-Rezeptor, so benannt, weil er zuerst auf den Azinuszellen des Pankreas charakterisiert werden konnte, bindet das C-terminale Heptapeptid einschließlich

des Tyrosin-Sulfats. Die Affinität dieses Rezeptors für CCK-8S ist 500 mal höher als die für unsulfatiertes CCK-8 und 10.000 mal höher als für CCK-4⁴³. Dieser Rezeptor ist hauptsächlich in der Peripherie verbreitet, wie z.B. auf Zellen des Pankreas, der Gallenblasenmuskulatur, der glatten Muskulatur des Pylorus, auf Neuronen des ösophagealen Sphinkters, auf dem myenterischen Plexus und dem Vagus. Aber auch in bestimmten Arealen des ZNS konnte er identifiziert werden, wie im interpedunkularem Nucleus, der Area postrema (AP) und dem Nucleus tractus solitarii (NTS)⁶⁸.

Der CCK-B-Rezeptor erkennt das C-terminale Tetrapeptid^{43, 47}. Dieser Rezeptor ist wesentlich unselektiver als der CCK-A-Rezeptor, da er eine nur 10 mal höhere Affinität für CCK-8S gegenüber dem CCK-8, Gastrin und CCK-4 aufweist. Er ist im Gehirn weit verbreitet, wofür auch das „B“, wie „brain“ steht und wurde in der Peripherie auf dem Vagus und nur bei einigen Spezies in der glatten Muskulatur des Magen-Darm-Traktes und des Pankreas gefunden^{9, 66, 67, 105}.

Wichtige neue Erkenntnisse über die Wirkungsweisen von endogenen CCK-A- und CCK-B-Rezeptoren ergaben sich nach der Entwicklung potenter und selektiver CCK-Rezeptor-Antagonisten. MK-329 (in der Literatur auch bekannt als L-364,718, Devazepide) ist ein selektiver CCK-A-Rezeptor-Antagonist und L-365,260 ein entsprechender Antagonist für CCK-B-Rezeptoren⁵.

1.6 Der Paraventriculäre Nucleus des Hypothalamus und dessen Interaktion mit anderen autonomen Hirnkernen

Erste Anhaltspunkte für eine direkte neuronale Verbindung des Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus mit dem Magen-Darm-Trakt erhielt man durch Versuche an adrenaletomierten Ratten, bei denen der intragastrale Druck durch die elektrische Stimulation des PVN oder des Hypophysenstiels gesenkt werden konnte. Nach bilateraler Läsion des PVN konnte die Druckverminderung durch die Stimulation des Hypophysenstiels jedoch nicht mehr herbeigeführt werden^{87, 106}.

Auch an pathologischen Prozessen, die im Verdauungstrakt ablaufen, scheint der PVN beteiligt zu sein; so entstanden bei Ratten z. B. akute gastroduodenale Ulzerationen durch die elektrische Stimulation des PVN²¹.

Der PVN ist als integratives Zentrum für die Koordination neuroendokriner und autonomer Funktionen als auch typischer Verhaltensweisen als Antwort auf unterschiedliche Stimuli verantwortlich¹¹⁶. Die elektrische Stimulation dieses Hirnkerns und die Injektion verschiedener Peptide beeinflusst die Magensäure- und Bikarbonatsekretion sowie das nahrungsabhängige Verhalten^{35, 36, 37, 87, 104}. Läsionen des PVN rufen eine Hyperphagie bei Ratten hervor, was auf seine Rolle bei der Nahrungsaufnahme hinweist². Des Weiteren konnte eine Abnahme der Magenmotilität durch direkte Stimulation des PVN erreicht werden¹⁰⁶. Eine Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bei Ratten, die aufgrund einer Punktmutation einen defekten Leptinrezeptor besitzen, durch die Nahrungsaufnahme keine CCK-Ausschüttung im PVN erfolgt und die Tiere zur Fettleibigkeit neigen¹³.

Um seine integrativen Funktionen im Bereich des autonomen Nervensystems erfüllen zu können, ist der PVN reich an Verbindungen zu anderen Hirngebietern. Eine Vielzahl von Neuronen des PVN projizieren zum NTS, zum DMV sowie zu präganglionären sympathischen und parasympathischen Zentren des Rückenmarks, in die weitere unterschiedliche peptiderge Neurone involviert sind^{46, 80, 107, 108, 115}. Neuronen des PVN projizieren weiterhin direkt zur Adeno- und Neurohypophyse, wo sie Einfluss auf die Freisetzung anderer Neuropeptide, wie z.B. Oxytocin, Thyreotropin-Releasing Hormon, Corticotropin-Releasing Faktor (CRF) und Neurotensin haben.

Neurone des Nucleus tractus solitarii erhalten afferente, vagal vermittelte Einflüsse oder Informationen aus dem gastrointestinalen System. Der NTS stellt vermutlich die primäre Relay-Station für neurosensorische Informationen aus dem Verdauungstrakt dar, die er direkt oder indirekt u. a. an übergeordnete Hirnregionen wie den PVN weitergibt. Exogenes CCK aktiviert über diesen Weg NTS-Neuronen, die zum PVN projizieren. Diese direkten Projektionen vom NTS zum PVN stellen vielleicht die neuroanatomische Basis für die durch die Nahrungsaufnahme ausgelöste und durch eine c-fos Expression nachweisbare Aktivierung von Neuronen im PVN dar.

Weiterhin sind efferente neuronale Verbindungen zwischen dem PVN und dem DVK beschrieben worden^{86, 116, 125}. Der PVN moduliert die neuronale Aktivität im DVK und es konnte gezeigt werden, dass die intraperitoneale Gabe von CCK-8S zur c-fos Expression in paraventriculären Neuronen führt, die zum DVK projizieren^{71, 75, 84}. Aber auch der LCK und die Ventro-Mediale Medulla (VMM) erhalten Afferenzen vom DVK und projizieren zum PVN. Da auch sie durch exogenes CCK aktiviert werden, könnte dieses zentrale Netzwerk in die afferente Übertragung von Informationen über den Eintritt von Nahrung in den Verdauungstrakt zum PVN involviert sein^{46, 70, 92, 102}.

Es gibt aber auch Ergebnisse, die gegen eine entscheidende Rolle der im Vorderhirn gelegenen Zentren an der Kontrolle der gastrointestinalen Abläufe sprechen. So waren decerebrale Ratten, trotz fehlender Verbindungen vom Vorderhirn zum DVK in der Lage, die Nahrungsaufnahme und weitere gastrale Funktionen zu regulieren²⁹.

Eine weitere wichtige Rolle spielt der PVN bei der Vermittlung zentralnervöser, stressinduzierter Änderungen der gastrointestinalen Funktionen. CRF, der wesentliche cerebrale biochemische Mediator von Stressreaktionen des Organismus, initiiert im PVN die durch Stress hervorgerufene Hemmung der Magenentleerung und die Stimulation des Colontransits^{72, 73, 74}.

In die cerebrospinale Flüssigkeit infundiertes CCK bewirkt in den autonomen Hirnkernen Veränderungen im Verdauungstrakt, wie z. B. die Steigerung der Magensäuresekretion, die Reduktion der Wasser- und Nahrungsaufnahme und die Modulation der Motilität¹²⁹. So ist bekannt, dass das Freßverhalten von Säugetieren durch die reziproke Aktivität des Lateralen Hypothalamus (LAH), eines Freß- Regulationszentrums und des Ventro-Medialen Hypothalamus (VMH), eines Sättigungs-Regulationszentrums kontrolliert wird und dass diese Effekte durch CCK moduliert werden. Der PVN ist ebenfalls an der zentral durch CCK im Gehirn und der durch peripheres CCK vermittelten Modulation der Nahrungsaufnahme beteiligt^{10, 22, 44}. Es gibt zudem Hinweise dafür, dass CCK-haltige Hirnneurone die Nahrungsaufnahme mittels CCK-haltiger Rezeptoren im PVN modulieren. So führt die Injektion von CCK-8 in den VMH zur Reduktion der Nahrungsaufnahme. Durch die Applikation eines CCK-B-Rezeptor-Antagonisten in dieses Kerngebiet kann eine Steigerung derselben

hervorgerufen werden. *In-vivo* Experimente konnten zeigen, dass postprandial paraventriculäres CCK freigesetzt wird ⁵¹.

Intracerebroventrikuläre Gabe von CCK-8 bewirkt eine Änderung der Darmmotilität. Im oberen Gastrointestinaltrakt ruft es ein irreguläres Kontraktionsmuster wie nach der Nahrungsaufnahme hervor ⁵². Im Colon kommt es zu einer Steigerung der Darmtätigkeit. Auch wenn die Motilität des Dickdarms infolge des rektocolonidalen inhibitorischen Reflexes, der durch eine Druckerhöhung im Rektum ausgelöst wird, unterdrückt wird, führt die Applikation von CCK-8 in das Ventrikelsystem zur Aufhebung des Reflexes und zu einer vermehrten Colonmotilität ³³. Nuclei des autonomen Nervensystems, von denen man weiß, dass sie an dieser Funktion beteiligt sind, sind der VMH und der NTS. So führt die Applikation von CCK-8 in den VMH zu einer Zunahme der Colonmotilität ⁷. Im NTS wiederum folgte auf die Peptidinjektion eine vermehrte Magenkontraktion, welche einen Anstieg des intragastralen Druckes zufolge hatte ⁷⁷. Eine Wirkung auf die gastrointestinale Motilität nach Applikation von CCK-8 in den LAH konnte nicht nachgewiesen werden ⁷. Ob dieser Neurotransmitter auch im PVN Einfluss auf diese Motilität hat, ist bisher nicht untersucht worden.

1.7 Fragestellungen

Der PVN nimmt eine Schlüsselstellung unter den autonomen Hirnkernen, die an der zentralen Modulation gastrointestinaler Funktionen beteiligt sind, ein. Gezeigt werden konnte, dass er eine wichtige Rolle bei der im Gehirn vermittelten Wirkung von CCK auf die gastrointestinale Motilität und die Sättigung spielt ^{10, 22, 44}. Da die Applikation von CCK-8 in die cerebrospinale Flüssigkeit Einfluss auf die Motilität im Magen-Darm-Trakt hat und *in-vivo* Experimente zeigen konnten, dass postprandial CCK-8 aus dem PVN freigesetzt wird ¹³, stellt sich die Frage, ob CCK diese spezifische Wirkung im PVN entfaltet. Hierfür spricht besonders, dass CCK-haltige Neuronen und CCK-Rezeptoren im PVN nachgewiesen werden konnten ^{54, 89}.

Des weiteren ist von Interesse, ob endogenes CCK im PVN eine physiologische Bedeutung in der ZNS-Regulation gastrointestinaler Motilität einnimmt und gegebenenfalls über welche Rezeptoren die Vermittlung dieser Wirkung von endogenem CCK erfolgt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb zu prüfen, inwieweit exogenes CCK im PVN Einfluss auf die Motilität in unterschiedlichen Bereichen des Magen-Darm-Traktes entfaltet. Diese Fragestellung untersucht der erste Teil der Arbeit, wobei separat die Auswirkungen von in den PVN mikroinjiziertem CCK-8S auf die propulsiven Motorfunktionen von Magen, Dünndarm und Colon bestimmt werden.

Im Falle eines positiven Ergebnisses sollte anschließend durch Applikation entsprechender Antagonisten in den PVN geklärt werden, ob endogenes CCK in diesem Hirnkern einen tonischen Einfluss auf den Transit des Colons hat und ob dieser über CCK-A- oder CCK-B-Rezeptoren im PVN vermittelt wird.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acetic Formalin	Merck AG, Darmstadt
Alcian blue 8GX	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Betaisodona [®]	Mundipharma GmbH, Limburg/Lahn
Chloroform	Merck AG, Darmstadt
Cholecystinin-Oktapeptid, sulfatiert	Saxon Biochemicals GmbH, Hannover
⁵¹ Chromium	New England Nuclear, Boston, MA, USA
D (+) Glukose × H ₂ O	Merck AG, Darmstadt
DePeX	Serva GmbH & Co. KG, Heidelberg
Dimethyl-Sulfoxid	Sigma Chemie, Deisenhofen
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
Essigsäure	Merck AG, Darmstadt
Ethanol	Merck AG, Darmstadt
Formaldehyd	Merck AG, Darmstadt
Gelatine	Merck AG, Darmstadt
Ketanest [®] 50	Parke-Davis GmbH, Freiburg
Kresylechtviolett	Chroma-Gesellschaft, Schmid GmbH & Co., Köngen
L-365.260	Merck Laboratories, Rahway, USA
MK-329	Merck Laboratories, Rahway, USA
NaCl-Lösung, 0,15 M	B. Braun, Melsungen
Natriumacetat	Merck AG, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck AG, Darmstadt
Natronlauge 5 N	Merck AG, Darmstadt

Paraformaldehyd	Merck AG, Darmstadt
Pikrinsäure z.A.	Merck AG, Darmstadt
Resin-Cement	Ivoclar, Schaan, Lichtenstein
Rinderserumalbumin	Serva GmbH & Co., Heidelberg
Rompun® 2%ig	Bayer AG, Leverkusen
Salzsäure, 1 N	Merck AG, Darmstadt
Trypan blue	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Tween 80	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Xanthum Gum	Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA
Xylol	Merck AG, Darmstadt

2.1.2 Geräte

Gamma-Counter	LKB Wallac, Turku, Finnland
Handstück-Bohrer	Foredom Electric Company, Bethel, USA
Kryostat 2800 Frigocut-E	Reichert-Jung GmbH, Nußloch
Lichtmikroskop CH-2	Olympus, Hamburg
Mikroliter-Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
OP-Lampe	Schott Glaswerke, Wiesbaden
PH-Meter	Wissenschaftlich-Technische-Werkstätten GmbH, Weilheim
Rasierapparat	Aesculap, Tuttlingen
Small Animal Stereotaxic Modell 900	David Kopf Instruments, Tujunga, USA
Stereo Zoom Mikroskop SZ40	Olympus, Hamburg
Waagen	Mettler GmbH, Gießen
Zentrifuge	Heraeus Instruments, Hanau

2.1.3 Verschiedenes

Cardiofil® 2-DR10 6/0; 0,7; 75 cm	B. Braun-Dexon GmbH, Spangenberg
Chromalaun	Merck AG, Darmstadt
Deckgläser	Fa. Kobe, Marburg
Macrolon-Käfige	Becker, Castrop-Rauxel
Marderhaarpinsel	Sundo, Marburg
Mikroinjektionsführungskanüle	Bilany Consultans GmbH, Düsseldorf
Mikroinjektionskanüle	Bilany Consultans GmbH, Düsseldorf
NC-Seide 2/0; 3; 75 cm	B. Braun, Melsungen
Objektträger	Kobe, Marburg
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Polyethylen-Schlauch	Becton Dickinson, Parsippany, USA
Q-tips	Elida Gibbs GmbH, Hamburg
Schrauben	Bilany Consultans GmbH, Düsseldorf
Silikonschlauch	Kalensee, Gießen
Skalpell	PFM GmbH, Köln
Standard Rattenfutter	Altromin GmbH & Co. KG, Lage
Tissue-Tek®	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Verbandsmull	Paul Hartmann AG, Heidenheim

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche sechs bis zehn Wochen alte Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 250 bis 300 g. Diese Tiere stammten vom Hannover-Stamm der Firma Winkelmann in Borcheln.

Die Haltung erfolgte unter *ad libitum* Zugang zu Trinkwasser und Standard-Rattenfutter (Altromin Standard-Diät) in Macrolon-Käfigen (42 × 26,5 cm). Die Raumtemperatur im Tierstall wurde unter kontrollierten Bedingungen mit einer Toleranz von $\pm 2^\circ \text{C}$ auf 22°C gehalten. Eine Zeitschaltuhr regelte den Tag-Nacht-Rhythmus der Tiere auf 14:10 Stunden. In dieser Umgebung blieben die Ratten mindestens eine Woche vor dem Versuchsbeginn.

2.3 Peptide

Alle Substanzen wurden unmittelbar vor Verwendung gelöst. Sulfatiertes Cholecystokinin-Oktapeptid wurde unmittelbar vor der experimentellen Verwendung in steriler 0,15 M NaCl-Lösung mit einem Zusatz von 0,1 % Rinderserumalbumin in Lösung gebracht.

Der CCK-A-Rezeptor-Antagonist MK-329 und der CCK-B-Rezeptor-Antagonist L-365,260 wurden in Dimethyl-Sulfoxid, Tween 80 und steriler 0,15 M NaCl-Lösung im Verhältnis 1:1:8 (v / v / v) gelöst. Beide Rezeptor-Antagonisten sind wasserunlöslich.

2.4 Lösungen

2.4.1 Phosphatpuffer

Der 0,1 M Phosphatpuffer wurde folgendermaßen hergestellt: 249,46 g Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 35,28 g Natriumhydrogenphosphat-Monohydrat wurden unter Erwärmung in 2 l Aqua destillata in Lösung gebracht. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt, indem bei

temperaturkalibrierter pH-Messung, 1 N Natronlauge oder 1 N Salzsäure zugefügt wurden. Der so entstandene 0,5 M Phosphatpuffer wurde mit Aqua destillata im Verhältnis 1:5 verdünnt, um einen 0,1 M Phosphatpuffer zu erhalten. Anschließend erfolgte die erneute Einstellung auf einen pH von 7,4.

2.4.2 Zamboni-Lösung

In 500 ml auf 60° C erhitztes Aqua destillata wurden 20 g Paraformaldehyd gelöst. Die anfangs trübe Lösung klärte sich nach Hinzugabe einiger Tropfen 1 N Natronlauge. 200 ml 0,5 M Phosphatpuffer wurden hinzugefügt und noch ungelöste Anteile des Paraformaldehyds durch Filtration entfernt. Nachdem 150 ml gesättigte Pikrinsäure (20 g Pikrinsäure gelöst in 1 l Aqua destillata) zugegeben wurden, erfolgte die Auffüllung der Lösung mit Aqua destillata bis zu einem Gesamtvolumen von 1 l. Anschließend wurde ein pH-Wert von 7,4 temperaturkalibriert eingestellt. Der gesamte Arbeitsvorgang erfolgte unter einer Dampfzugesaugenrichtung.

2.4.3 Lösungen für die Nissl-Färbung

Für die Färbung nach Nissl wurden folgende Lösungen hergestellt:

- Acetatpuffer: 1 Teil Natriumacetat, 2,72 %ig
4 Teile Essigsäure, 1,2 %ig
- Kresylechtviolettlösung: 0,5 g Kresylechtviolett
100 ml Acetatpuffer pH 4,0
- Acetic-Formalin: 4 ml Formaldehyd, 40 %ig
0,2 ml Essigsäure, konz.
100 ml Aqua desillata

2.5 Histologie

2.5.1 Beschichtung von Objektträgern

Die Voraussetzung für eine optimale Beurteilung der Gewebeschnitte ist die Unversehrtheit sowie die gute Haftung des Schnittes auf dem Objektträger. Während des Färbe- und Eindeckvorganges löst sich das Gewebe leicht vom Träger. Um eine bessere Haftung zu erzielen, wurden die Objektträger daher mit Chromalaun-Gelatine-Adhäsiv beschichtet.

Hierzu wurden 3 g Gelatine in 60° C warmen Aqua destillata gelöst und anschließend mit 500 mg Chromalaun versetzt. Nach Abkühlung der Lösung auf 40° C wurden die Objektträger durch ein 4 minütiges Tauchbad beschichtet. Bei 50° C trockneten sie im Wärmeschränk und konnten dann bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

2.5.2 Gewebefixation

Ziel der Fixation ist es, das Gewebe so zu konservieren, dass dessen Morphologie so wenig wie möglich beeinträchtigt wird. Die mit Ketanest[®] (100 mg / kg-KG i.p.) und Rompun[®] (10 mg / kg-KG i.p.) anästhesierten Tiere wurden zuerst mit 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer und anschließend mit 500 ml Zamboni-Lösung transcardial perfundiert. Nach Herausnahme des Gehirns wurde dieses zur weiteren Fixierung für mindestens 24 Stunden in Zamboni-Lösung aufbewahrt.

Autolytische Prozesse sowie ein ungehindertes Wachstum von Mikroorganismen, was zur Veränderung bzw. Zerstörung des Gewebes führen würde, kann hierdurch verhindert werden.

Die Zamboni-Lösung ist eines der besten Gemische zur Gewebestabilisation und Fixation bei weitgehender Erhaltung der Zellstruktur. Die Pikrinsäure bewirkt hierbei eine wasserlösliche Ausfällung des Eiweiß als Proteinpikrat, was zur Schrumpfung ohne Härtung führt. Mittels des Paraformaldehyds wird eine Vernetzung der Proteine untereinander bewirkt.

2.5.3 Kryostatpräparation

Nach erfolgter Fixation der Gehirne in Zamboni-Lösung wurden sie zur Entwässerung für weitere 24 Stunden in 25 %iger Glukoselösung aufbewahrt.

Anschließend wurden die Gehirne mit Hilfe des Tissue Tek[®] auf dem Gefriertisch des Kryostats zentriert und bei -16° C aufgefroren. Serielle Coronarschnitte mit einer Stärke von 30 µm wurden angefertigt, die als frei flottierende Schnitte in mit Phosphatpuffer gefüllten Gewebekulturschalen aufbewahrt wurden.

2.5.4 Aufziehen der Gewebeschnitte

Während des Aufziehens befanden sich die Gewebeschnitte in einer mit Gelatinelösung gefüllten Petrieschale. Zur Herstellung dieser Lösung wurden 1 g Gelatine unter Erwärmung in 130 ml Aqua destillata gelöst und mit 100 ml Ethanol versetzt. Aus der 50° C warmen Gelatinelösung wurden die Schnitte mit einem Marderhaarpinsel der Größe 2-3 auf die mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen und bei Raumtemperatur getrocknet.

2.5.5 Nissl-Färbung

Die Gewebeschnitte wurden mit der Färbemethode nach F. Nissl (1884 entwickelt) zur vergleichenden Lokalisation von Hirnregionen sowie zur Lagekontrolle der Mikroinjektionskanülen gefärbt.

Angefärbt werden Nervenkerne und Trigoidschollen (sogenannte Nissl-Substanz) durch den basischen Farbstoff Kresylechtviolett aufgrund gleicher DNS-Zusammensetzung. Der Farbstoff lagert sich an die sauren Gruppen der Nukleinsäuren an, wodurch Nervenkerne und Trigoidschollen violett erscheinen, während sich die übrigen Nervenzellanteile schwach blau darstellen.

Die auf Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträgern aufgebrachten getrockneten Gehirnschnitte wurden hierzu in den folgenden Flüssigkeiten nacheinander inkubiert.

Aqua destillata	2 Min.
Kresylechtviolettlösung	1 Min.
Spülen mit Aqua destillata	
Acetic-Formalin	1 Min.
Spülen mit Aqua destillata	
Ethanol 70 %ig	1 Min.
Ethanol 80 %ig	1 Min.
Ethanol 95 %ig	1 Min.
Ethanol 100 %ig	1 Min.
Xylol	15 Min.

2.5.6 Klärung und Eindeckung der Präparate

Nach der Färbung wurde den Schnitten durch die Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe Wasser entzogen. Anschließend bewirkte die 15 minütige Einwirkung von Xylol eine Klärung, die dem Präparat eine homologe Lichtbrechung verleiht.

Zur langfristigen Erhaltung der Präparate wurden sie durch ein Deckglas (0,1 mm stark) abgedeckt, nachdem vorher der Kunstharz DePeX als luftdichtes Einschlußmittel auf die Präparate aufgetragen wurde.

2.6 Vorbereitung der Tiere

2.6.1 Implantation einer chronischen cerebralen Mikroinjektionsführungskanüle

Die Anästhesie der Ratten erfolgte durch eine einmalige intraperitoneale Injektion, bestehend aus einer Mischung aus Rompun® (5 mg / kg-KG) und Ketanest® (75 mg / kg-KG).

Nach der Rasur des Kopfes erfolgte dessen Positionierung und Arretierung im stereotaktischen Gerät. Das OP-Gebiet wurde mit Betaisodona® desinfiziert und die Schädelkalotte mit Skalpell

und scharfem Löffel freipräpariert. Die Führungskanüle (eine bilaterale 26 Gauga Mikroinjektionsführungskanüle) wurde auf das dargestellte Bregma gerichtet und die Koordinaten (anterior-posterior) entsprechend den Angaben des Atlas von Paxinos und Watson berechnet.

Die Bezugspunkte für die genaue Bestimmung des Mikroinjektionspunktes und der Eindringtiefe sind:

- a) die intraaurikuläre Fixation des Tieres,
- b) das Bregma (= Treffpunkt zwischen der Frontal- und den beiden Temporalschuppen des knöchernen Schädels).

Die Führungskanüle wurde nach den errechneten Daten neu justiert und das Trepanationsgebiet markiert. In diesem Gebiet wurde die Kalotte mit dem Elektro-Bohrer unter mikroskopischer Sicht bis zur Darstellung der Dura mater eröffnet. Am Rand des Knochenfensters erfolgte die Verankerung von 3 Stahlschrauben, die der späteren Befestigung der Kanüle am Schädeldach dienten. Nun wurde die Führungskanüle vorsichtig in das Gehirn des Tieres abgesenkt und zwar so, dass die Spitze der Kanüle 3 mm oberhalb des PVN zu liegen kam.

Nach Säuberung und Trocknung des OP-Feldes erfolgte die Fixierung der Kanüle mittels Dentalzement an den im Schädel befestigten Schrauben. Die Härtung des Zements wurde abgewartet und anschließend der Hautschnitt unter Verwendung von NC-Seide (3,0 metric, 2/0 USP) durch U-Nähte geschlossen. Zum Schutz vor Verunreinigungen wurde die Führungskanüle mit einem Schraubverschluß versehen.

Postoperativ überwachten wir die Tiere für 30 Minuten. Innerhalb dieser Zeitspanne wurden sie durch eine Wärmelampe vor dem Auskühlen geschützt und erwachten aus der Narkose. Nach diesem Eingriff wurden die Ratten in Einzelkäfigen gehalten. Die operative Implantation der gastrointestinalen Katheter erfolgte frühestens nach 7 Tagen.

2.6.2 Intracerebrale Mikroinjektion am wachen Tier

Zur gezielten intracerebralen Injektion am wachen Tier wurden chronische, bilaterale Mikroinjektionsführungskanülen implantiert. Vor Durchführung der Versuche wurde der Ablauf der Injektion mit jedem Tier mehrmals praktiziert, um die Ratten an diesen Ablauf zu gewöhnen, und die Verfälschung der experimentellen Ergebnisse durch zusätzlichen Stress der Tiere zu verhindern. Ein lichtundurchlässiges Tuch über dem Kopf des Tieres schirmte die Ratte von der Umgebung ab, ohne sie in ihren Bewegungsmöglichkeiten einzuschränken. An die Situation gewöhnte Tiere verhielten sich hierbei ruhig.

Der Schraubverschluß der Führungskanüle wurde entfernt und die Injektionskanüle (30 G) über die Führungskanüle vorgeschoben. Die Länge der Injektionskanüle war vorher so bemessen worden, dass sie 3 mm über das Ende der Führungskanüle hinausragte und somit jetzt im PVN zu liegen kam. Ein Gesamtvolumen von 100 nl (entspricht 50 nl pro Seite) wurde über jeweils 30 Sekunden in das Hirngewebe injiziert. Zur Injektion diente eine 2 µl Hamilton Spritze, die über einen Polyethylenschlauch mit der Injektionskanüle verbunden war. Um ein Zurückfluten des Injektats in den Injektionsstichkanal und die Führungskanüle zu verhindern, wurde die Mikroinjektionskanüle nach vollständiger Injektion für weitere 30 Sekunden in dieser Position belassen. Abschließend wurde die Führungskanüle wieder verschlossen.

2.6.3 Lokalisationskontrolle der intracerebralen Mikroinjektion

Nach dem Ende der Versuchsreihe wurden die Ratten mit der Mischung aus Rompun® (5 mg / kg-KG) und Ketanest® (75 mg / kg-KG) anästhesiert und 100 nl des Farbstoffes (100 nl 0,05 % Alcian blue 8GX) wurden unter den oben beschriebenen üblichen Versuchsbedingungen in die Hirnkerne injiziert. Hiernach erfolgte die transcardiale Perfusion der Tiere und die Aufarbeitung der Gehirne, bis sie nach Nissl gefärbt unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden konnten. Der tiefste Einstichpunkt der Injektionskanüle wurde als tatsächliche Lokalisation gewertet und auf Reproduktionen der neuroanatomischen Hirntafeln des Atlas von Paxinos und Watson dokumentiert.

Alle hiermit ermittelten Injektionen, die innerhalb einer Distanz von 300 µm zu den anatomischen Grenzen des PVN lagen, wurden als Injektionen innerhalb dieses Kerns gewertet. Alle Lokalisationsermittlungen erfolgten ohne Kenntnis der experimentell ermittelten Daten des jeweiligen Tieres. Da bei diesen Versuchen stets eine bilaterale Injektion durchgeführt worden war, wurden alle Tiere, bei denen nur eine Injektion korrekt lokalisiert war, von der Versuchsauswertung ausgeschlossen. Ebenso wurde mit den Ergebnissen von Ratten verfahren, bei denen eine Anfärbung der Ventrikel festgestellt werden konnte.

2.6.4 Herstellung chronischer gastrointestinaler Mikrokatheter

Die Katheter wurden aus einem Polyethylenschlauch (Innendurchmesser 1,2 mm, Außendurchmesser 1,7 mm) hergestellt. Das eine Ende des Schlauches wurde über einer Flamme erwärmt und durch die hierdurch erhaltene Formbarkeit zu einem Flansch moduliert. Ein 5 mm langer Silikonschlauch (0,8 mm × 1,6 mm) war durch Einwirkung von Chloroform kurzzeitig so erweitert worden, dass er über das unveränderte Ende des Polyethylenschlauches bis auf 3 mm vor den Flansch gezogen werden konnte. Nach Verdunstung des Chloroforms zog sich das Silikon zusammen und bildete somit einen zweiten, fest auf dem Polyethylenschlauch fixierten Flansch.

2.6.5 Implantation gastrointestinaler Mikrokatheter

Nach intraperitonealer Injektion von Rompun[®] (5 mg / kg-KG) und Ketanest[®] (75 mg / kg-KG) erfolgte die Rasur von Abdomen und Nacken und die mehrmalige Desinfektion dieses Gebietes mit Betaisodona. Das Abdomen wurde durch eine mediale Laparotomie entlang der Linea alba eröffnet und der Magen, das Duodenum oder das Colon unter Schonung der Nervenzüge stumpf mobilisiert.

2.6.5.1 Implantation eines chronischen Magenkatheters

An der großen Krümmung des Rattenmagens befindet sich ein makroskopisch gut abgrenzbarer, nicht-glandulärer Bereich, in dessen mittleren Abschnitt die Eröffnung des Organs mittels

Stichinzision erfolgte. Nachdem der Katheter hineingeschoben, der äußere Flansch intraluminal und der Silikonflansch extraluminal plaziert worden war, wurde der Magen durch eine Tabaksbeutelnaht (Cardiofil® 2-DR 10, 0,7 6/0 75 cm) verschlossen und der Silikonflansch am Magen fixiert.

2.6.5.2 Implantation eines chronischen Duodenalkatheters

Die Eröffnung der Duodenalwand erfolgte mittels Stichinzision 2 cm distal des Pylorus. Der Katheter wurde so plaziert, dass der äußerer Flansch intraluminal und der Silikonflansch extraluminal zu liegen kam. Der Verschluß erfolgte durch eine Tabaksbeutelnaht (Cardiofil® 2-DR 10, 0,7 6/0 75 cm). Anschließend wurde das Duodenum am Silikonflansch fixiert.

2.6.5.3 Implantation eines chronischen Colorkatheters

Der ileo-coecale Übergang wurde aufgesucht und die Wand des Colons 1 cm distal davon inzidiert. Der äußere Flansch des Mikrokatheters wurde intraluminal und der Silikonflansch extraluminal plaziert. Mittels einer Tabaksbeutelnaht (Cardiofil® 2-DR 10, 0,7 6/0 75 cm) wurde die Öffnung verschlossen und der Silikonflansch an der Darmwand fixiert.

Das darüber zuliegen kommende ventrolaterale Peritoneum wurde scharf durchstoßen, der Katheter durch diese Öffnung hindurch geführt und mit einer durch das Silikon geführten Naht am Peritoneum fixiert (Cardiofil® 2-DR 10 0.7, 6/0, 75 cm). Nach Spülung des Abdomens mit steriler 0,15 M NaCl-Lösung erfolgte der Verschluß der Bauchhöhle durch eine fortlaufende Naht (NC-Seide 3,0 2/0, 75 cm). Der Mikrokatheter wurde durch einen stumpf präparierten subcutan laufenden Tunnel bis zum Nackenbereich geführt und dort nach außen geleitet. Um den Katheter herum wurde der Nackenschnitt mit Einzelknopf-Nähten (NC-Seide 3,0 2/0, 75 cm), sowie die mediale Laparotomie mittels Einzel-U-Nähten (NC-Seide 3,0 2/0, 75 cm) verschlossen. Abschließend wurde durch Spülung mit 0,15 M NaCl-Lösung der Katheter auf leichte Durchgängigkeit hin überprüft und mit einem Steckstöpsel verschlossen. Mit Hilfe eines Klettverbandes konnte der Mikrokatheter auf dem Rücken des Tieres befestigt werden. Eine

Spülung der gastrointestinalen Katheter wurde alle zwei Tage durchgeführt. An experimentellen Untersuchungen nahm das Tier frühestens sieben Tage nach der Implantation teil.

Eine halbe Stunde postoperativ wurden die Tiere vor Auskühlung durch eine Wärmelampe geschützt und beobachtet.

2.7 Bestimmung gastrointestinaler Funktionen

2.7.1 Bestimmung der Magenentleerung

Zur Durchführung dieser Untersuchung wurde zuerst ein semiliquider, nicht resorbierbarer Marker hergestellt, indem 250 mg Xanthum Gum in 10 ml mit $^{51}\text{Chromium}$ versetztem 0,15 M NaCl gelöst wurde. Den Tieren wurde 0,4 μCi $^{51}\text{Chromium}$ in 1,5 ml Xanthum Gum über den Katheter in den Magen injiziert und der Mikrokatheter anschließend mit 0,2 ml 0,15 M NaCl gespült. Für den Zeitraum von einer Stunde wurden die Ratten wieder in ihren Käfig gebracht, um die Magenentleerung nicht durch zusätzlichen Streß zu verändern. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere mit Rompun[®] (5 mg / kg-KG i.p.) und Ketanest[®] (75 mg / kg-KG i.p.) anästhesiert. Die Eröffnung des Abdomens erfolgte. Bevor der Magen entnommen wurde, wurde der Pylorus sowie die Cardia ligiert, um ein Heraustreten des Markers zu verhindern. In 10 ml 0,15 M NaCl wurde das Organ homogenisiert, mit 0,15 M NaCl bis zu einem Gesamtvolumen von 25 ml aufgefüllt und bei 5000 \times g für 20 Minuten zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde anschließend entnommen und für 1 Minute im Gamma-Counter gemessen.

Um für diesen Wert eine Bezugsgröße zu bekommen, anhand derer die Magenentleerungsrate objektiviert werden konnte, wurde die 1-minütige Emission von 1 ml einer durch das Mischen von 0,4 μCi $^{51}\text{Chromium}$ in 1,5 ml Xanthum Gum mit 23,5 ml 0,15 M NaCl hergestellten Standardlösung ermittelt.

Die Magenentleerung wurde errechnet als:

$$x \% = 100 - (\text{Desintegrationen in der Probe pro Minute} \times 100 / \text{Desintegrationen im Standard pro Minute}).$$

2.7.2 Bestimmung des Dünndarm- bzw. des Colontransits mit dem geometrischen Zentrum

Zur Ermittlung der Dünndarm- sowie der Colonmotilität während einer kurzen Beobachtungszeit, wurde die Bestimmung des geometrischen Zentrums als gewichteter Parameter des Dünndarm- bzw. des Colontransits benutzt. Ein semiliquider, nicht resorbierbarer Marker bestehend aus 250 mg Xanthum Gum, welches in 10 ml mit 51 Chromium versetztem 0,15 M NaCl gelöst wurde, wurde hergestellt. 0,4 μCi 51 Chromium in 0,2 ml Xanthum Gum wurde den Ratten bei Versuchsbeginn durch die implantierten Dünndarm- oder Colonkatheter injiziert. Gleich anschließend erfolgte die Spülung des Katheters mit 0,2 ml 0,15 M NaCl, wodurch der sich im Katheter befindende Markeranteil in den Darm des Tieres gelangte. Die Ratten wurden dann für eine Stunde in ihren Käfig und in die vertraute Umgebung des Tierstalles gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere mit Rompun[®] (5 mg / kg-KG, i.p.) und Ketanest[®] (75 mg / kg-KG, i.p.) anästhesiert, das Abdomen eröffnet und der Dünndarm bzw. das Colon sehr vorsichtig, um eine Dislokation des Markers zu vermeiden, reseziert. Bei der Ermittlung des Dünndarmtransits wurde dieser Darmabschnitt distal des Pylorus und proximal des Caecums abgesetzt. Bei der Messung des Colontransits erfolgte die Absetzung proximal des Caecums und distal des Colon descendens. Die entnommenen Darmabschnitte wurden in jeweils 10 gleich lange Segmente unterteilt, die in separate Glasröhrchen gegeben wurden. Die Emission jedes Segmentes wurde im Gamma-Counter gemessen. Das geometrische Zentrum wurde aus diesen Werten nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Geometrisches Zentrum} = \frac{\sum ((\text{Desintegrationen in Darmsegment} \times 1,2,\dots,10 / \sum \text{Desintegrationen der Darmsegmente} \times 1,2,\dots,10) \times \text{Darmsegment-Nummer} \times 1,2,\dots,10)}{\sum \text{Desintegrationen der Darmsegmente} \times 1,2,\dots,10}$$

Auf diese Weise erfolgte die Bestimmung des propulsiven Transportes des Markers, wobei kleine Zahlenwerte einen langsamen und große Werte einen schnellen Transit anzeigen.

2.7.3 Messung der Colontransitzeit

Die Tiere befanden sich während dieses Versuches in speziellen Käfigen, welche es ermöglichten, ihre Pellets auf einem darunter laufendem Fließband auf zu fangen. Zur Gewöhnung an diese Versuchsbedingungen wurden die Ratten 12 Stunden vor Versuchsbeginn in diese Käfige gesetzt, in denen sie freien Zugang zu Futter und Trinkwasser hatten.

0,2 ml Trypan blue, ein liquider, nicht-resorbierbarer Farbstoff wurde den Tieren zu Beginn der 24-stündigen Beobachtungszeit unmittelbar nach der intracerebralen Mikroinjektion in den implantierten Colorkatheter injiziert. Der Katheter wurde anschließend mit 0,2 ml 0,15 M NaCl gespült. Das Zeitintervall zwischen der Farbstoffinjektion und der ersten Entleerung von gefärbtem Stuhl ergab die Colontransitzeit. Beim Auftreten von Diarrhöen wurde jede Entleerung von flüssigem Stuhl einer Entleerung von geformtem Stuhl, sprich Pellet gleichgesetzt.

2.8 Versuchsdurchführungen

2.8.1 Versuchsablauf zur Bestimmung der Magenentleerung, des Dünndarm- oder des Colontransits

Frühestens 14 Tage vor diesem Versuch war den Ratten eine Mikroinjektionsführungskanüle direkt oberhalb des PVN, sowie ein chronischer, gastrointestinaler Katheter in den Magen, das Duodenum oder in das Colon implantiert worden. Nach diesen Eingriffen waren die Tiere in Einzelkäfigen unter *ad libitum* Zugang zur Rattenstandard-Diät und zum Trinkwasser gehalten worden und hatten darunter an Gewicht zugenommen. Durch regelmäßiges Training wurden sie an den Menschen und an die Versuchssituation gewöhnt.

Der Versuchsbeginn lag zwischen 9.00 und 10.00 Uhr. *Ad libitum* Zugang zu Trinkwasser hatten die Ratten bis unmittelbar vor dem Experiment, während ihnen 18 Stunden vorher feste Nahrung entzogen worden war.

Den Tieren wurde bilateral eine Gesamtdosis von 1,5 µg oder 3,0 µg CCK-8S oder als Kontrolle das Vehikel (0,1 % BSA in 0,15 M NaCl) in den PVN injiziert. Zur Bestimmung der Magenentleerung, des Dünndarm- oder Colontransits wurde hiernach der radioaktive Marker injiziert. Für eine Stunde wurden die Ratten wieder in ihre Käfige im Tierstall gebracht. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte die Anästhesie der Tiere mit Rompun® (5 mg / kg-KG, i.p.) und Ketanest® (75 mg / kg-KG, i.p.) und die vorsichtige Entnahme des Magens zur Bestimmung der Magenentleerung, bzw. des Dünndarms oder des Colons zur Ermittlung des Transits. Das Gehirn wurde nach bilateraler Farbstoffinjektion und der transcordialen Perfusion zur Lokalisation der Mikroinjektionen entnommen.

2.8.2 Versuchsablauf zur Bestimmung der Colontransitzeit

Etwa 14 Tage vor dem ersten Experiment war den Tieren eine chronische, bilaterale Mikroinjektionsführungskanüle direkt oberhalb des PVN implantiert worden. Um eine optimale Erholung der Ratten zu gewährleisten, erfolgte die Haltung in Einzelkäfigen und die Anlage eines chronischen Colorkatheters erst eine Woche später. Frühestens 7 Tage nach der letzten Operation wurden die Tiere in eine Versuchsreihe eingegliedert. In der Zwischenzeit hatten sie bei freiem Zugang zu Trinkwasser und Rattenfutter an Gewicht zugenommen und waren an den Umgang mit Menschen sowie die Versuchssituation gewöhnt worden.

Bei dieser Studie konnte jedes Tier als seine eigene Kontrolle dienen, da ihnen in randomisierter Reihenfolge der CCK-A-Rezeptor-Antagonist MK-329 (1,5 µg / Ratte), der CCK-B-Rezeptor-Antagonist L-365,260 (1,5 µg / Ratte) und das Vehikel (0,1 % BSA in 0,15 M NaCl) jeweils in einem Volumina von 100 nl bilateral injiziert werden konnte. Zwischen den unterschiedlichen Injektionen lag ein Zeitraum von mindestens 6 Tagen.

18 Stunden vor Experimentbeginn wurden die Ratten in die speziellen Versuchskäfige gesetzt, wo sie weiterhin *ad libitum* Zugang zu Nahrung und Trinkwasser hatten. Die Versuche begannen zwischen 9.00 und 10.00 Uhr mit der cerebralen Mikroinjektion und der anschließenden Gabe von 0,2 ml Trypan blau über den Colorkatheter und der Spülung desselben mit 0,2 ml 0,15 M NaCl. Während der 24-stündigen Beobachtungszeit hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser nicht aber zur Standard Ratten-Diät.

Nach der Durchführung aller 3 Experimente wurden die Ratten mit Rompun® (5 mg / kg-KG, i.p.) und Ketanest® (75 mg / kg-KG, i.p.) anästhesiert, der Farbstoff bilateral mikroinjiziert und nach der transcordialen Perfusion das Gehirn zur Lagekontrolle der Führungskanüle entnommen.

2.9 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen wurden als Mittelwert \pm SEM (Mittlere Standardabweichung) angegeben. In der weiteren statistischen Analyse erfolgte ein Vergleich der einzelnen Gruppen mittels ANOVA sowie durch den Student-Newman-Keuls Multiple Range-Test oder den Dunn's Test. Es wurde ein 5 % - Signifikanzniveau angenommen, d.h. ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Effekt von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die Magenentleerung

Die Injektion von CCK-8S erfolgte bilateral in den PVN der Ratten. Die Quantifizierung der Magenentleerung bestimmten wir durch die Ermittlung des nach 60 Minuten aus dem Magen entleerten prozentualen Anteils der applizierten Radioaktivität.

Bei korrekter bilateraler Lokalisation der Mikroinjektionskanülen innerhalb des PVN konnte nach einer Stunde eine signifikante Inhibition der Magenentleerung verzeichnet werden (siehe Abbildung 1).

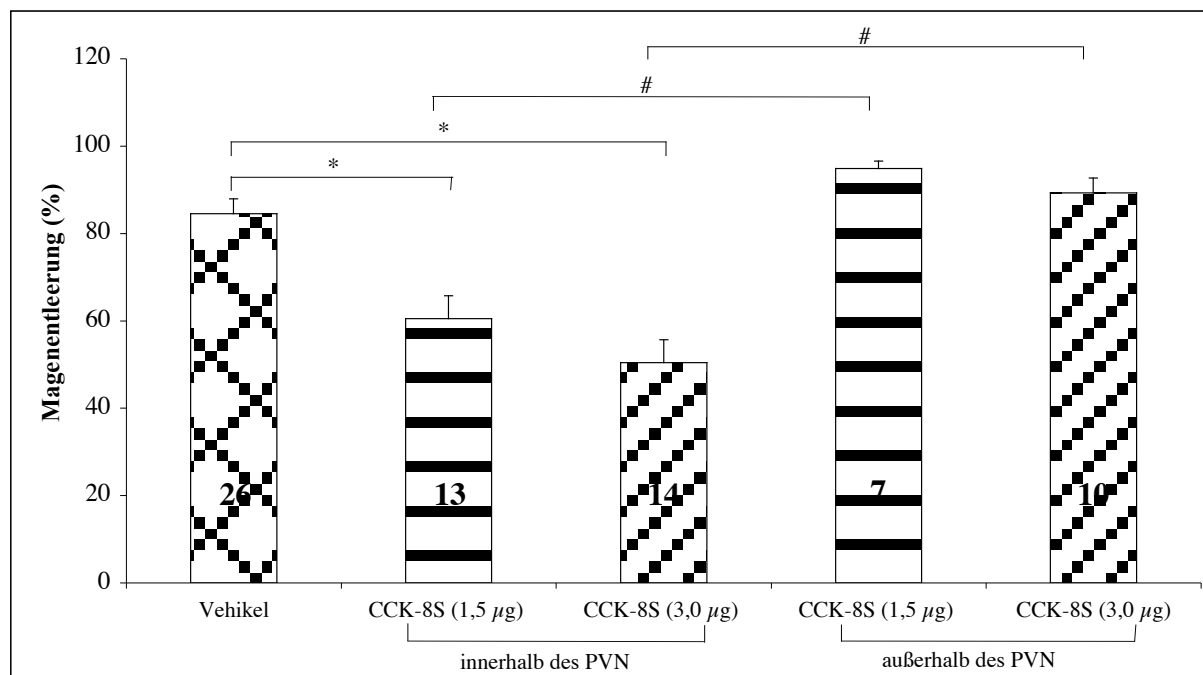


Abb. 1: Effekt von CCK-8S bei bilateraler Mikroinjektion in den PVN auf die Magenentleerung bei wachen, gefasteten Ratten.

* $p < 0,05$ versus Vehikel; # $p < 0,05$ versus außerhalb des PVN.

Nach der Injektion des Vehikels betrug die Magenentleerung 84,54 %. Die erhobenen Daten nach der Injektion des Vehikels wurden gepoolt, da kein Unterschied zwischen der Mikroinjektion innerhalb - zu außerhalb des PVN bestand. Die Magenentleerung wurde durch

die Applikation von 1,5 µg CCK-8S pro Ratte signifikant auf 60,51 % reduziert. Eine noch ausgeprägtere Reduktion der Magenentleerung auf 50,46 % erfolgte bei Steigerung der CCK-8S Dosis auf 3,0 µg pro Tier. Bei Lokalisation der Mikroinjektion von CCK-8S in außerhalb des PVN gelegenen hypothalamischen Kerngebieten konnte keine signifikante Inhibition der Magenentleerung beobachtet werden (Abbildung 1).

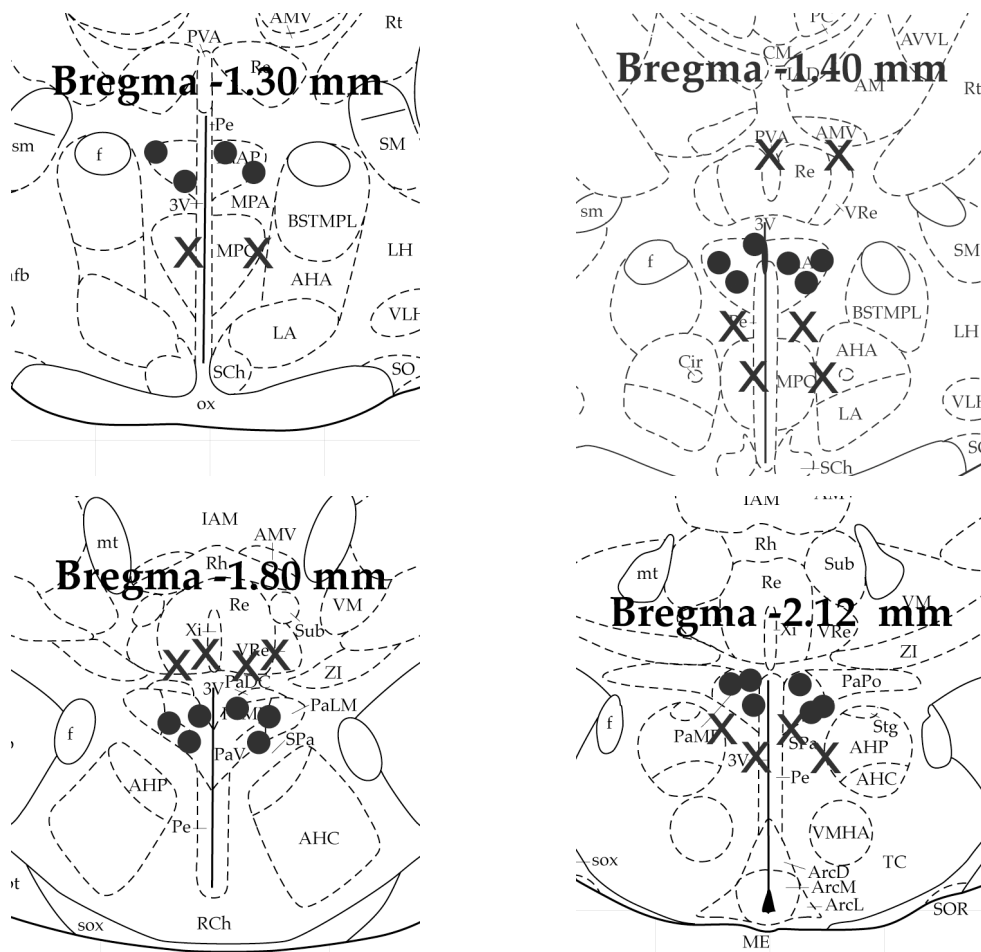


Abb 2: Repräsentative Darstellung der Lokalisationen der in der Datenanalyse verwendeten Mikroinjektionen von CCK-8S in den PVN: ● und außerhalb des PVN: X. Die nicht gezeigten Lokalisationen, der in die Studie eingegangenen Mikroinjektionen waren ähnlich verteilt. Die Zahlen geben die Distanz zum Bregma an.

3.2 Effekt von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Dünndarmtransit

Die Berechnung des Dünndarmtransits erfolgte nach der Methode des geometrischen Zentrums. CCK-8S in einer Dosis von 1,5 µg pro Ratte induzierte bei bilateraler Mikroinjektion in den PVN eine Verzögerung des Dünndarmtransits im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der mit CCK-8S behandelten Gruppe betrug das geometrische Zentrum 11,59 (Abbildung 3). Bei den Tieren, denen statt dessen das Vehikel mikroinjiziert wurde, lag der ermittelte Wert bei 19,16. Eine leichte Verlangsamung des Dünndarmtransits konnte bei den Ratten beobachtet werden, denen CCK-8S in an den PVN angrenzende Areale des Hypothalamus mikroinjiziert wurde. Im Gegensatz zur Applikation des Peptids in den PVN ist dieser Effekt allerdings nicht signifikant (Abbildung 3).

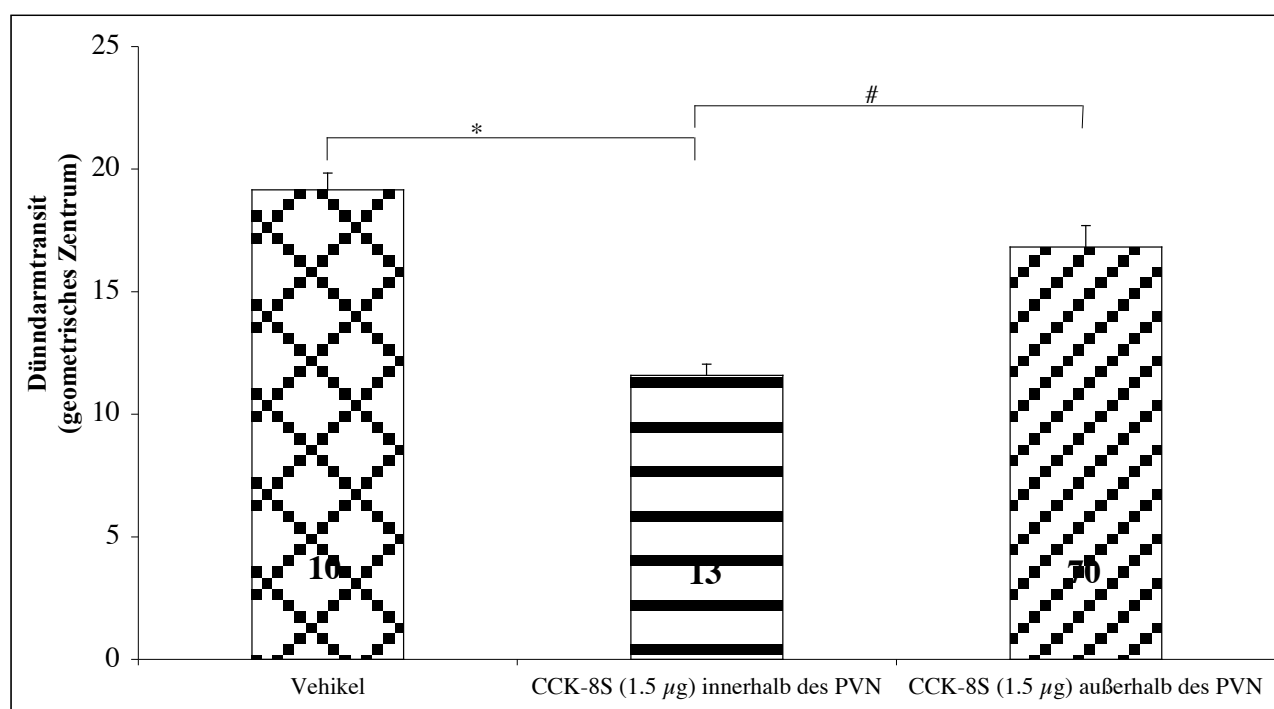


Abb. 3: Effekt von CCK-8S bei bilateraler Mikroinjektion in den PVN auf den Dünndarmtransit bei wachen, gefasteten Ratten.

* $p < 0,05$ versus Vehikel; # $p < 0,05$ versus außerhalb des PVN.

3.3 Effekt von CCK-8S im Paraventrikulären Nucleus des Hypothalamus auf den Colontransit

In dieser Studie wurde den Tieren CCK-8S oder das Vehikel bilateral in den PVN mikroinjiziert und der Colontransit nach der Methode des geometrischen Zentrums berechnet.

Bei Injektionen von 1,5 μg sowie von 3,0 μg CCK-8S pro Ratte in diesen hypothalamischen Hirnkern konnte eine signifikante Beschleunigung des Colontransportes beobachtet werden. Das geometrische Zentrum der Tiere, denen das Vehikel injiziert wurde, betrug 3,12 (Abbildung 4). Nach der Mikroinjektion von 1,5 μg bzw. 3,0 μg CCK-8S pro Tier in den PVN konnte ein Anstieg des geometrischen Zentrums auf Werte von 4,58 bzw. 4,79 verzeichnet werden. Bei Mikroinjektion dieser Dosen von CCK-8S in hypothalamische Areale in unmittelbarer Nähe der PVN-Grenzen war kein signifikanter Anstieg des geometrischen Zentrums festzustellen (Abbildung 4).

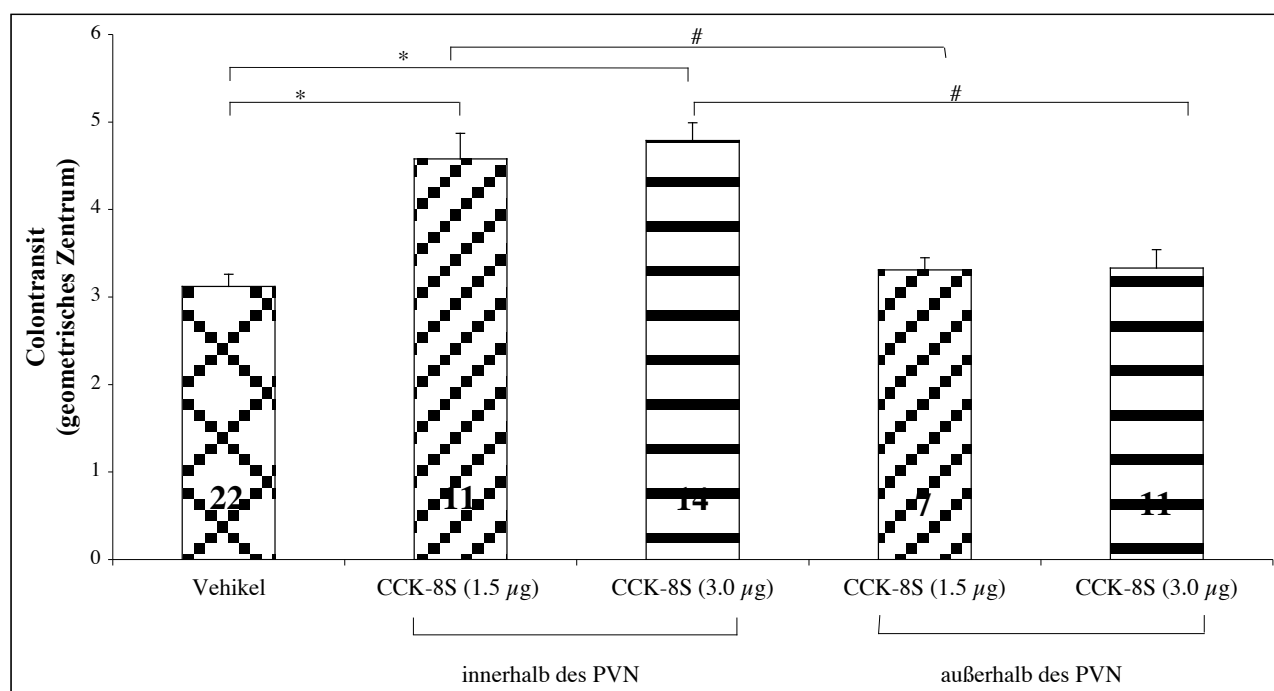


Abb. 4: Effekt von CCK-8S bei bilateraler Mikroinjektion in den PVN auf den Colontransit bei wachen, gefasteten Ratten. * $p < 0,05$ versus Vehikel; # $p < 0,05$ versus außerhalb des PVN.

3.4 Effekte von CCK-A- und CCK-B-Rezeptor-Antagonisten im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die Colont transitzeit

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob endogenes CCK im PVN an der ZNS-Kontrolle des Colont transit beteiligt ist und ob dies durch CCK-A- oder CCK-B-Rezeptoren vermittelt wird. Dazu wurde den Tieren Antagonisten des CCK-A- oder CCK-B-Rezeptors oder das Vehikel bilateral in den PVN mikroinjiziert. Anschließend erfolgte die Applikation des Farbstoffes in das proximale Colon.

Die Injektion von 1,5 µg des CCK-A-Rezeptor-Antagonisten MK-329 in den PVN führte nicht zu einer signifikanten Änderung der Colont transitzeit (Abbildung 5).

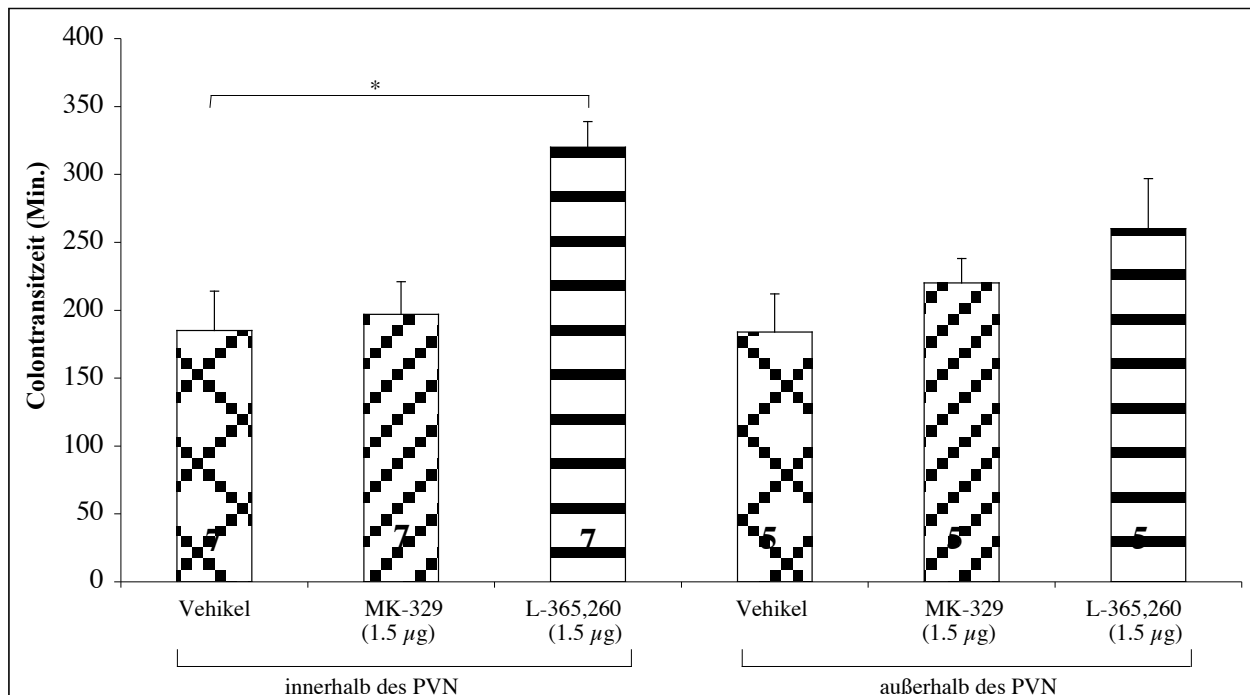


Abb. 5: Effekte des CCK-A-Rezeptor-Antagonisten MK-329 und des CCK-B-Rezeptor-Antagonisten L-365,260 bei bilateraler Mikroinjektion in den PVN auf die Colont transitzeit bei * $p < 0,05$ versus Vehikel.

Hingegen resultierte eine signifikante Verlängerung der Colont transitzeit nach der Mikroinjektion des CCK-B-Rezeptor-Antagonisten L365,260 in derselben Dosierung in diesen Hirnkern. Die Zeitspanne vom Beginn des Versuches bis zur Ausscheidung des ersten gefärbten Pellets stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe, denen das Vehikel injiziert wurde, um 73 % an (Abbildung 5).

Auch nach Injektion des CCK-B-Rezeptor-Antagonisten in die angrenzenden Kerngebiete des PVN war eine leichte Zunahme der Colontransitzeit zu beobachten, die aber statistisch nicht signifikant war (Abbildung 5). Ein derartiger Trend konnte bei den außerhalb des PVN gelegenen Mikroinjektionen des CCK-A-Rezeptor-Antagonisten in hypothalamische Areale nicht verzeichnet werden.

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Das inadäquate Abläufe innerhalb regulatorischer Mechanismen der Hirn-Darm-Achse gastroenterologische Funktionsstörungen und konsekutiv die Ausbildung von Symptomen zur Folge haben können, die ohne nachweisbare morphologische Veränderungen einhergehen, ist naheliegend. Um Neurotransmitter-assoziierte Störungen der Magen-Darm Funktionen bewerten und Therapien entwickeln zu können, bedarf es zuerst der Kenntnis ihrer physiologischen Wirkungsmechanismen und Wirkorte. Vor diesem Hintergrund wird daher erstrangig untersucht, welche Neurotransmitter in welchen cerebralen Strukturen an welchen Mechanismen in der Wechselbeziehung von Gehirn und Magen-Darm-Trakt beteiligt sind.

4.2 Diskussion der Effekte von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf die Magenentleerung und den Dünndarmtransit

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, die Wirkung von CCK-8S im PVN auf die Magenentleerung und den Dünndarmtransit zu bestimmen. In zwei Studien wurde die spezifische Wirkung dieses Peptids im PVN auf die propulsive Motilität der jeweiligen Abschnitte des Verdauungstraktes untersucht. Hierfür wurde in einem etablierten Tiermodell CCK-8S in den PVN mikroinjiziert.

Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass exogenes CCK-8S im PVN in verschiedenen Abschnitten des oberen Verdauungstraktes verzögernd auf den gastrointestinalen Nahrungstransport wirkt.

Dabei war eine dosisabhängige Steigerung der Wirkung von CCK im PVN auf die propulsiven Motorfunktionen von Magen und Dünndarm fest zu stellen.

Die periphere und zentrale Wirkung von CCK auf die Motilität von Magen und Dünndarm ist identisch. So berichteten Giralt und Vergara, dass die intraarterielle Applikation von CCK-8 zu

einer Verzögerung der Magenentleerung führt und die propulsive Motilität im Dünndarm gehemmt wird ²⁶. Diese Daten entsprechen den Beobachtungen der ZNS-Effekte von CCK. Der Sinn identischer Effekte könnte in einer doppelten Absicherung der Modulationsmöglichkeit von CCK auf die Motilität des oberen Gastrointestinaltraktes bestehen, die durch zwei getrennt voneinander existierende Regelkreise gewährleistet wird.

Als hinlänglich bewiesen gilt weiterhin, dass die periphere Gabe von CCK in verschiedenen Spezies, so auch beim Menschen, zu einer Verzögerung der Magenentleerung führt ^{1, 53, 77}.

4.3 Auswirkungen von CCK auf den Migrating Motor Complex

Die Peristaltik im Magen und Dünndarm unterliegt einem dreiphasigen, zyklischen, interdigestivem Muster, wobei in

- Phase I: keine Kontraktionen;
- Phase II: Kontraktionen in irregulärer Frequenz;
- Phase III: reguläre Kontraktionen die vom Magenantrum ausgehend über weite Abschnitte des Dünndarms fortgeleitet und beobachtet werden können ¹¹⁷.

Diese bezeichnet man als Migrating Motor Complex (MMC). Nahrungsaufnahme unterbricht den eben beschriebenen Ablauf der drei Phasen und ruft ein postprandiales Muster der Motilität und Sekretion hervor, wobei das Ausmaß der endokrinen Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen im Gastrointestinaltrakt, und somit auch von CCK, abhängig ist von der Phase, in der sich der MMC zum Zeitpunkt der Nahrungsaufnahme befindet ⁶⁴. So führt die Nahrungsaufnahme in der späten Phase II zu einer stärkeren Ausschüttung von CCK, Neotensin, Insulin und Gastrin als in der Phase I. Es gibt Hinweise dafür, dass die Unterbrechung des MMC durch CCK-vermittelt verläuft. Für die vorrangige Wirkung von CCK bei Unterbrechung der Phase II durch die Nahrungsaufnahme spricht, dass die intravenöse Gabe von CCK-A- und B-Rezeptor-Antagonisten diese Wirkung der Nahrungsaufnahme während dieser Phase verhindern kann ⁴.

Appliziert man Ratten CCK-8 intravenös und zwar in einer Dosierung, die dem CCK-Plasmaspiegel nach der Nahrungsaufnahme entspricht, unterbricht dies den MMC und induziert ein Kontraktionsmuster wie nach der Nahrungsaufnahme⁷⁸. Dies spricht für eine entscheidende Bedeutung von CCK bei der durch Nahrungsaufnahme vermittelten Änderung der Motilitätsparameter im oberen Gastrointestinaltrakt. Wird eine picomolare CCK-8 Dosis in die cerebrospinale Flüssigkeit mikroinfundiert, führt dies ebenfalls zur Auslösung des Kontraktionsmusters wie nach der Nahrungsaufnahme⁸. Da bei peripherer Gabe eine wesentlich höhere Dosis verabreicht werden muß, um eine entsprechende Wirkung hervor zu rufen, schließt sich die Überlegung an, ob zwei getrennte Regelkreise peripher und zentral beide vermittelt CCK-8 in der Lage sind, diese Änderungen der Motilitätsparameter hervor zu rufen. Es wäre auch denkbar, dass der Ursprung dieser Modulation der Motilitätsparameter des oberen Magen-Darm-Traktes zentral ist, und dass CCK-8 nach peripherer Applikation die Blut-Hirn-Schranke überwindet und zentral wirkt, was wiederum die unterschiedlichen Schwellendosen erklären würde.

Dass die Applikation von CCK in den PVN in Abhängigkeit der MMC Phasen eine unterschiedliche Auswirkung auf die Magenentleerung sowie den Dünndarmtransit hat, ist nicht auszuschließen^{63, 88}. Bei unserer Studie wurde dieser Aspekt nicht berücksichtigt.

4.4 Diskussion der Effekte von CCK-8S im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Colontransit

In dieser Arbeit wurde im Tiermodell ebenfalls die Wirkung von exogenem CCK-8S im PVN auf den Colontransit untersucht.

Die bilaterale Applikation von CCK-8S in den PVN in einer Dosis von 1,5 µg und 3,0 µg führte zu einer deutlichen Steigerung des geometrischen Zentrums, einem gut validiertem Parameter zur Quantifizierung der propulsiven Motorfunktion des Colons. Die signifikante Zunahme der Werte des geometrischen Zentrums spiegeln einen schnelleren Transport des radioaktiven Markers innerhalb des Colons wieder. Dies bedeutet, dass CCK-8S bei Mikroinjektion in den PVN die propulsive Colonmotilität stimuliert.

Von mehreren Arbeitsgruppen wird ebenfalls über eine Zunahme der Colonmotilität nach peripherer und zentraler CCK-8 Gabe berichtet^{32, 51, 112}. Wobei es Hinweise dafür gibt, dass die postprandiale Zunahme der propulsiven Motorfunktion des proximalen Colon ausschließlich zentral vermittelt wird. So hatte die intravenöse Gabe von CCK-Rezeptor-Antagonisten im Gegensatz zur zentralen Gabe keinen Effekt auf die postprandiale propulsive Motorfunktion⁴. Auch der Zustand der erfolgten Nahrungsaufnahme, d. h. Unterschiede zwischen dem nüchternen und dem postprandialen Zustand, können die Auswirkungen von CCK auf den Colont transit beeinflussen. Beispielsweise ist bekannt, dass die genauen Bedingungen der Experimente von entscheidender Bedeutung für die Wirkung von CCK im Organismus ist. So zeigten *in vitro* Studien an zirkulären Muskelfasern des Meerschweinchencolons, dass diese erst nach Aufhebung der basalen tonischen Inhibition auf CCK-8 reagieren¹²⁸.

4.5 Die lokalisationspezifische Wirkung der diskutierten Ergebnisse

Dafür, dass die eben beschriebenen Funktionsänderungen der gastrointestinalen Motilität auf einer lokalisationspezifischen Wirkung von CCK-8S im PVN beruhen, sprechen folgende Überlegungen:

Das eine Leckage von CCK-8S in das Ventrikelsystem stattgefunden hat, und dadurch die beschriebenen Wirkungen aufgetreten sind, können wir ausschließen, da jedem Tier nach Abschluß des Experimentes ein Farbstoff unter denselben Bedingungen wie das Peptid in das Gehirn mikroinjiziert wurde. Dies ermöglichte es uns, diejenigen Tiere zu bestimmen und aus der Datenanalyse zu eliminieren, bei denen CCK-8S in den 3. Ventrikel gelangt war und somit eine systemische cerebrale CCK-Wirkung angenommen werden mußte.

Das CCK-8S durch Diffusion oder durch ein Zurückfluten entlang der Injektionskanüle seine Wirkung in anderen Hirnregionen entfaltet hat ist nicht anzunehmen, da die Mikroinjektion des Peptides in hypothalamische Areale dorsal der Grenzen des PVN zu keinem Effekt führte.

Ebenso führte die Applikation der CCK-Rezeptor-Antagonisten in hypothalamische Bezirke außerhalb des PVN zu keiner Veränderung der Colont transitzeit. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass der Effekt von endogenem CCK im PVN auf den Colont transit über CCK-B-Rezeptoren

vermittelt wird, und dass diese Wirkung von endogenem CCK im Hypothalamus lokalisationspezifisch für den PVN ist.

4.6 Diskussion der CCK-Rezeptor vermittelten endogenen Effekte im Paraventriculären Nucleus des Hypothalamus auf den Colons transit

In einer weiterführenden Studie wurde aufgrund der stimulierenden Wirkung von exogenem CCK im PVN auf den Colons transit untersucht, ob endogenes CCK im PVN einen tonisch-stimulierenden Einfluss auf die Colons motilität ausübt. In diesen Experimenten sollte gleichzeitig ermittelt werden, welche CCK-Rezeptoren an der durch CCK im PVN vermittelten Modulation der Colons motilität beteiligt sind. Hierzu wurden spezifische Antagonisten für den CCK-A-Rezeptor (L-364,718) oder den CCK-B-Rezeptor (L-365,260) in einer Dosis von 1,5 µg bilateral in den PVN appliziert und die Colons transitzeit bestimmt.

Die Mikroinjektion des CCK-B-Rezeptor-Antagonisten in den PVN führte zu einer signifikanten Verzögerung der Colons transitzeit, während die Applikation des CCK-A-Rezeptor-Antagonisten keine relevanten Effekte auf die Colons transitzeit erkennen ließ.

Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Beobachtungen aus autoradiographischen und Liganden-Bindungsstudien, in denen gezeigt werden konnte, dass im zentralen Nervensystem vorwiegend CCK-B-Rezeptoren exprimiert werden und der PVN eine besonders hohe Dichte an CCK-B-Rezeptoren aufweist, deren lokale Expressions durch experimentell induzierte Veränderungen des endokrinen Systems zudem gesteigert werden kann⁶⁵. Die hier gewonnenen Daten stehen auch in Übereinstimmung mit zurückliegenden Studien, die von einer wesentlichen Rolle der zentralen CCK-B-Rezeptoren in der Regulation der Magen-Darm-Motilität und der Nahrungsaufnahme berichten. Die CCK induzierte Sättigung und Stimulation der Colons motilität konnte durch die zentrale Gabe eines CCK-B-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden¹⁷. Für die wesentliche Bedeutung der CCK-B-Rezeptoren bei zentral vermittelten CCK Effekten spricht weiterhin, dass die durch systemische CCK-Applikation hervorgerufene c-fos Expression in Neuronen des Hypothalamus, nicht aber in Hirnstammneuronen, durch die vorherige Gabe eines CCK-B-Rezeptor-Antagonisten verhindert werden kann⁵⁶. Im Gegensatz zur zentralen

CCK-vermittelten Regulation der gastrointestinalen Motilität, wird der Einfluss von CCK in der Peripherie daher hauptsächlich durch CCK-A-Rezeptoren vermittelt; wobei gezeigt wurde, dass relevante CCK-vermittelte sensorische Informationen aus dem Verdauungstrakt über auf dem Vagusnerv befindliche CCK-A-Rezeptoren zum PVN mediiert werden^{12, 41, 70, 111, 113, 122}.

Aus der hier vorliegenden Studie läßt sich nunmehr der Schluss ziehen, dass endogenes CCK im PVN eine wesentliche Rolle bei der integrativen Regulation und Koordination der Colonmotilität spielt.

4.7 Die Rolle des PVN innerhalb des zentralen autonomen Netzwerkes für die ZNS-Regulation der gastrointestinalen Motilität

Da der PVN eines der cerebralen Regulationszentren autonomer Aktivität ist, d. h. zu einem Netzwerk von Hirnkernen gehört, dass die Regulation von Vitalfunktionen gewährleistet, kann man hier ausgelöste Effekte auf die gastrointestinale Motilität nicht isoliert betrachten. Auch wenn er also eine bedeutende Rolle in der ZNS-Koordination der gastrointestinalen Motilität einnimmt sind zweifelsfrei auch andere cerebrale Strukturen, wie der Locus Coeruleus-Komplex, der Laterale Hypothalamus (LH), die Ventromediale Medulla (VMM), der Ventromediale Hypothalamus (VMH), der DMN und der NTS an der integrativen Kontrolle und Koordination gastrointestinaler Motilität durch das ZNS beteiligt^{75, 76, 119, 125}.

Beispielsweise führt die bilaterale Läsion des PVN zu einer akuten Steigerung der Magenmotilität; entsprechend scheint der PVN unter Normalbedingungen eine basale tonische Inhibition auf den Magen aus zu üben. Diese Steigerung der Magenmotilität war drei Tage nach Verursachen der Läsion nicht mehr nachweisbar, woraus sich schließen läßt, dass hierfür mehrere zentrale Kontrollmechanismen existieren, die nach der Zerstörung des PVN dessen Kontrollfunktionen übernehmen²².

In dieselbe Richtung weisen Studien die zeigen, dass die Applikation von CCK-8 in den NTS, der als zentrale „Umschaltstation“ von Afferenzen aus dem Verdauungstrakt gilt, die er dann an andere Hirnkerne weiterleitet, über eine Verminderung des zentralen Druckes und der transienten

Blockade von phasischen Magenkontraktionen zu einer Verzögerung der Magenentleerung führt ¹¹⁹.

In elektrophysiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Dehnung des distalen Colons zu einer Abnahme der Colonmotilität führt. Dafür, dass diesem Vorgang ein zentral verschalteter Mechanismus zugrunde liegt, spricht die Tatsache, dass die Dehnung des distalen Colons eine c-fos Expression im NTS und PVN hervorruft ³³. Weiterhin konnte eine Zunahme der Entladungsrates von LCK-Neuronen beobachtet werden ¹⁹. Dies weist daraufhin, dass das Colon einen afferenten Einfluss auf Neurone des NTS, PVN und LCK ausübt. Dieser inhibitorische Reflex kann durch mehrere cerebrale Neuropeptide moduliert werden. So führt die intracerebroventrikuläre Applikation von CCK zu einer Abschwächung des inhibitorischen Reflexes, während die periphere Injektion des Transmitters keine Auswirkung erkennen lässt ³³. Die Wirkung der Mikroinjektion von CCK in die Cerebrospinalflüssigkeit kann durch die Applikation eines CCK-A-Rezeptor-Agonisten (A-71378) nicht jedoch des CCK-B-Rezeptor-Agonisten (A-63387) reproduziert werden ³³. Eine zentrale Modulation des inhibitorischen Reflexes scheint also über an CCK-A-Rezeptoren wirkendes CCK möglich zu sein.

Dafür, dass der PVN sowie auch der VMH eine entscheidende, vielleicht auch additive oder synergistische Rolle bei der Kontrolle der gastrointestinalen Funktionen durch CCK spielen, spricht, dass der höchste CCK-Spiegel im PVN gemessen wurde. Da der CCK-Spiegel postprandial im VMH steigt, ist anzunehmen, dass er ebenfalls wie der PVN an der Regulation postprandialer gastrointestinaler Abläufe durch CCK beteiligt ist. Außerdem ist die größte Dichte an Bindungsstellen mit einer hohen Affinität für CCK im VMH gefunden worden ¹¹.

Weitere Daten sprechen dafür, dass diese CCK-8 vermittelte Modulation im VMH ausgelöst wird. So führt die Mikroinfusion von CCK-8 in den VMH zur Unterbrechung des MMC und zur Ausbildung eines Kontraktionsmusters entsprechend dem nach der Nahrungsaufnahme ⁷.

4.8 Modulation der gastrointestinalen Motilität durch andere Neurotransmitter

Bekannt ist, dass nicht nur CCK sondern auch andere Neurotransmitter im zentralen Nervensystem Einfluss auf die gastrointestinale Motilität haben, wobei neuere Studien dafür sprechen, dass CCK an der Vermittlung der Wirkung von Leptin und Oxytocin auf die Magenentleerung beteiligt ist^{24, 60, 123, 124}. Oxytocin kommt in größeren Mengen im PVN vor, so dass es denkbar ist, dass diese Substanz ebenfalls durch Wirkung im PVN an der ZNS-Regulation gastrointestinaler Motilität beteiligt ist. Die Injektion von Oxytocin in die Cerebrospinalflüssigkeit oder in den PVN führt zu einer Beschleunigung der Magenmotilität während die periphere Gabe hierauf keinen Einfluss hat. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass endogenes Oxytocin im Gehirn einen tonisch inhibitorischen Effekt auf die Magenmotilität ausübt^{81, 82, 83}. Weiterhin bekannt ist, dass die zentrale CCK-Gabe zu einer vermehrten cerebralen Sekretion von Oxytocin führt^{23, 59, 123, 124}.

Leptin ruft zentral gegeben eine synergistische Wirkung zu CCK sowohl in Bezug auf die Magenentleerung als auch auf das Sättigungsgefühl hervor. So ist bei Ratten der Gewichtsverlust größer, wenn ihnen CCK und Leptin zugeführt wird, als wenn sie nur eine Substanz erhalten. Weiterhin ist bekannt, dass der PVN einen Angriffspunkt für Leptin darstellt¹²⁶.

Auch zwischen dem endogenen Hirnpeptid Tyr-MIF-1 und CCK-8 zeichnet sich in Bezug auf die Regulation der gastrointestinalen Motilität eine Interaktion ab. Die intracerebroventrikuläre Applikation von Tyr-MIF-1 verursacht eine differenzierte Stimulation der antralen und duodenalen myoelektrischen Aktivität: Im Duodenum unterbricht es ähnlich wie CCK den MMC und führt zu einem irregulären Kontraktionsmuster. Dieser Effekt von Tyr-MIF-1 auf das Duodenum kann durch intracerebroventrikuläre Injektion von CCK-B-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden, was dafür spricht, dass entweder der CCK-B-Rezeptor-Antagonist an denselben Rezeptortyp bindet wie Tyr-MIF-1 oder die Wirkung von intracerebroventrikulär gegebenem Tyr-MIF-1 auf das Duodenum über CCK-B-Rezeptoren vermittelt wird; zumal die Gabe von CCK-A-Rezeptor-Antagonisten in die Cerebrospinalflüssigkeit keine Auswirkung zeigt⁶⁹.

Neben CCK, Oxytocin, Leptin und Tyr-MIF-1 wirken auch Bombesin und NPY intracerebroventrikulär appliziert auf die gastrointestinale Motilität. Bombesin ruft unter diesen Bedingungen ein digestives und NPY ein interdigestives Kontraktionsmuster hervor²⁵.

Weitere Neurotransmitter wie Sekretin, Östradiol, Serotonin, TRH und Neurotensin üben in Hirnkernen Effekte auf die Transitzeit aus, wobei es wesentlich weniger Untersuchungen zur Wirkung auf das Colon gibt als auf den oberen Gastrointestinaltrakt. Inwieweit es sich hierbei um pharmakologische Mechanismen handelt, ist nicht endgültig geklärt⁵⁸.

4.9 Der Effekt von CCK auf die Sättigung

Zahlreiche Beobachtungen sprechen dafür, dass für die Nahrungsaufnahme, die Motilität des oberen Gastrointestinaltraktes und das Sättigungsgefühl eine integrative zentralnervöse Regulation besteht, an der CCK-abhängige Mechanismen beteiligt sind. Dafür spricht unter anderem, dass der endogene CCK-Spiegel im Gehirn sowie in der peripheren Blutbahn vom Sättigungszustand des Organismus abhängig ist; nach der Nahrungsaufnahme ist die cerebrale CCK-Konzentration deutlich höher als bei gefasteten Tieren⁶². *In-vivo* Experimente zeigen, dass es postprandial zu einer Freisetzung von CCK im PVN kommt¹³. Zudem senkt sowohl die exogene periphere sowie die intracerebroventriculäre Gabe von CCK dosisabhängig die Nahrungsaufnahme^{14, 61}. Durch die Zufuhr entsprechender Antikörper und Antagonisten, deren Applikation sowohl peripher als auch zentral erfolgt, kann die Mahlzeitgröße moduliert werden^{17, 48, 101}. Endogenes CCK im Gehirn und in der Peripherie scheint also an der physiologischen Regulation der Nahrungsaufnahme beteiligt zu sein, wobei die CCK-abhängigen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Hinsichtlich der dabei beteiligten CCK-Effekte auf die Sättigung ist anzunehmen, dass diese zumindest teilweise durch Änderungen der Motilität des Gastrointestinaltraktes und u. a. des Magendrucks ausgelöst werden^{119, 120}. So ist beschrieben worden, dass peripher oder intracerebroventrikulär appliziertes CCK den intragastralen Druck über die Relaxierung der Corpusmuskulatur senkt und zur Stimulation isolierter pylorischer Kontraktionen führt; diese Abläufe verzögern die Magenentleerung. Es wäre

möglich, dass CCK-8S im PVN auch über die eben beschriebenen Funktionsänderungen der Magenmotilität die gastrale Entleerung verzögert und somit ein Sättigungsgefühl induziert.

Da die Tiere während des Versuchs freien Zugang zu Futter und Trinkwasser hatten, ist anzunehmen, dass es infolge von Nahrungsaufnahme zur Freisetzung von CCK im Gastrointestinaltrakt gekommen ist, welches vermittels des Vagus zu einer vermehrten Sekretion dieses Transmitters im PVN geführt haben könnte, was dann die Magenentleerung reduziert und konsekutiv ein Sättigungsgefühl hervorruft²⁰.

Auch die Konsistenz und der Kaloriengehalt der Nahrung hat Einfluss auf die Magenentleerung. So steigert kalorienreiche und visköse Nahrung das Sättigungsgefühl und verzögert die Magenentleerung⁵⁷. Parenterale Ernährung führt bei Hunden zwar zu einer Reduktion der Menge der bei einer Scheinfütterung aufgenommenen Nahrung um 50-60 %, aber eine vollkommene Sättigung wird bei parenteraler Kalorienzufuhr nicht erreicht⁹⁵. Insbesondere der Eintritt von lipidreicher Nahrung in den oberen Gastrointestinaltrakt führt zur Sekretion von CCK aus den endokrinen Zellen des Dünndarms in die Blutbahn und es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass endogenes CCK direkt an den durch die Modulation der gastrointestinalen Motilität hervorgerufenen Einflüssen auf das Sättigungsgefühl beteiligt ist^{27, 109}.

Unser Ergebnis weist auf die Möglichkeit hin, dass endogenes CCK im PVN über eine Verzögerung der Transitzeit im oberen Verdauungstrakt zur Beendigung der Nahrungsaufnahme beiträgt.

Um diese Möglichkeit definitiv zu klären, wären allerdings weitere Studien notwendig, in denen zu prüfen ist, ob durch CCK-Gabe in den PVN die Nahrungsaufnahme gehemmt wird, die Nahrungsaufnahme durch Gabe von spezifischen CCK-Antagonisten in den PVN gesteigert und diese Effekte vom Füllungszustand des Magens abhängig sind.

5 Zusammenfassung

Der PVN ist als Kern des autonomen Netzwerkes an der Regulation und Integration zahlreicher gastrointestinaler Funktionen beteiligt. Von dem Neurotransmitter CCK weiß man, dass er in der efferenten und afferenten Interaktion von Gehirn und Verdauungstrakt eine wichtige Rolle spielt. Bekannt ist, dass er modulierend auf die propulsive Motilität wirkt. Inwieweit CCK im PVN Einfluss auf die Motilität des Verdauungstraktes nimmt ist bisher nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob exogenes CCK-8S im PVN Einfluss auf die Motilität des Magens sowie des Dün- und Dickdarms ausübt.

Zur Beantwortung dieser Frage wurde wachen, freilaufenden Ratten eine definierte Menge eines nicht resorbierbaren radioaktiven Markers in den Magen infundiert. Anschließend mikroinjizierten wir bilateral CCK-8S in den PVN. Die Bestimmung des Umfangs der Magenentleerung erfolgte über die Messung des prozentualen Anteils des nach 60 Minuten aus dem Magen entleerten radioaktiven Markers. Während der einstündigen Beobachtung induzierte CCK-8S lokalisationsspezifisch im PVN eine dosisabhängige Reduktion der Magenentleerung. In der Kontrollgruppe war der radioaktive Marker nach 60 Minuten zu 84,5% aus dem Magen der Tiere entleert worden. Unter dem Einfluss von 1,5 μ g bzw. 3,0 μ g CCK-8S im PVN waren nach einer Stunde nur 60,5% bzw. 50,5% des radioaktiven Markers entleert.

Die Bestimmung des Dünndarm- und Dickdarmtransits unter dem Einfluss von bilateral in den PVN injiziertem CCK-8S erfolgte über die Berechnung des geometrischen Zentrums. Auch hierbei wurde ein semiliquider, nicht resorbierbarer, radioaktiver Marker in den jeweils zu untersuchenden Darmabschnitt eingebracht. Nach einer Stunde wurde der Dünndarm bzw. Dickdarm reseziert und in mehrere Segmente unterteilt. Durch die Messung der Emission der einzelnen Segmente konnten Rückschlüsse über den Transport des Markers und damit der propulsiven Motorfunktion geschlossen werden.

Das geometrische Zentrum des Dünndarms der Kontrolltiere betrug 19,2. Nach der Injektion von 1,5 μ g CCK-8S sank es auf 11,6, was für eine Verzögerung der propulsiven Motilität spricht.

Nach der Applikation von 1,5µg CCK-8S erreichte das geometrische Zentrum des Colons den Wert 4,6 und nach Injektion von 3,0 µg sogar 4,8. Dies zeigt einen beschleunigten Transport des Markers nach Injektion von CCK-8S in den PVN an.

Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass CCK-8S lokalisationspezifisch im PVN modulierend auf die Motilität des Dick- und Dünndarms sowie auf die Magenentleerung wirkt, wobei im oberen Verdauungstrakt eine Verzögerung des Chymustransportes zu verzeichnen ist, während die Propulsion von Stuhl im distalen Abschnitt des Gastrointestinaltraktes stimuliert wird.

Der zweite Teil der Studie sollte klären, ob CCK unter physiologischen Bedingungen modulierend auf die Colonmotilität wirkt. Um zu bestimmen ob und über welchen Rezeptor endogenes CCK Einfluss auf den Colons transit nimmt, wurde den Tieren der spezifische CCK-A-Rezeptor-Antagonist MK-329 und der spezifische CCK-B-Rezeptor-Antagonist L-365,260 in einer Dosis von 1,5 µg bilateral in den PVN injiziert. Unmittelbar darauf wurde 0,2 ml Trypan blue in den Colonskatheter gegeben. Während der 24-stündigen Beobachtungszeit befanden sich die Ratten in speziellen Käfigen, die das Auffangen der Pellets auf einem darunter laufenden Fließband ermöglichten. Über das Ausscheiden des ersten gefärbten Pellets ermittelten wir die Colons transitzeit.

Nach Injektion des CCK-B-Rezeptor-Antagonisten in den PVN verzögerte sich der Colons transit im Gegensatz zur Kontrollgruppe, denen ein Vehikel injiziert worden war um 73%. Die vorherige Gabe des CCK-A-Rezeptor-Antagonisten zeigte keine Wirkung.

Endogenes CCK wirkt also im PVN über CCK-B-Rezeptoren stimulierend auf die propulsive Motorfunktion des Colons.

Da CCK auch bei „Ausschaltung“ des PVN Einfluss auf die gastrointestinale Motilität nimmt, ist anzunehmen, dass die Wirkung dieses Neurotransmitters im PVN hauptsächlich modulierender Art ist, während die Basis-Regulation durch intrinsische Hirnstamm-Regelkreise sichergestellt wird.

So scheint CCK sowohl in der Peripherie wie auch im Gehirn und hier in unterschiedlichen Hirnkernen Einfluss auf den Chymustransport zu nehmen. Weiterhin bekannt ist, dass eine Vielzahl von Neurotransmittern und Hormonen im Zusammenspiel mit CCK oder unabhängig

davon die propulsive Motilität des Verdauungstraktes, wobei die genaue Wirkung abhängig von der Ausgangssituation zu sein scheint, beeinflusst. Die hier untersuchte Modulation der gastrointestinalen Motilität scheint also nur eine Komponente in einem sehr komplexen Regelsystem zu sein. Wobei diese Zusammenhänge auch nicht isoliert betrachtet werden dürfen, da sich Auswirkungen auf andere Funktionen, wie z. B. die Sättigung abzeichnen.

Die Aussagen, zu denen wir nach unseren Untersuchungen fähig sind:

- Exogenes CCK-8S im PVN verzögert die Magenentleerung und den Dünndarmtransit, während es den Transit im Colon steigert,
- Endogenes CCK im PVN wirkt über CCK-B-Rezeptoren stimulierend auf den Colontransit,
- Die Bedeutung des cerebraler Neurotransmitters CCK für die efferente Interaktion von Hirnkernen mit dem Verdauungstrakt bei physiologischen Prozessen wurde durch unsere Ergebnisse belegt.